

# **Defekte in der N-Glykosylierung und programmierter Zelltod in *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

der  
Naturwissenschaftlichen Fakultät III –  
Biologie und vorklinische Medizin  
der  
Universität Regensburg



vorgelegt von

**Peter Hauptmann**  
aus Eitensheim

Regensburg, Oktober 2007

Promotionsgesuch eingereicht am: 10.10.2007

Tag des Kolloquiums:

Die Arbeit wurde geleitet von: Prof. Dr. L. Lehle

Prüfungsausschuss: Vorsitzender: Prof. Dr. T. Dresselhaus

Erstgutachter: Prof. Dr. L. Lehle

Zweitgutachter: Prof. Dr. H. Tschochner

Drittprüfer: Prof. Dr. W. Seufert

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen .....	6
<b>I. Einleitung .....</b>	<b>8</b>
<b>I.1 Apoptose .....</b>	<b>10</b>
I.1.1 Programmierter Zelltod/Apoptose – ein historischer Überblick.....	10
I.1.2 Die Rolle der Apoptose bei Pflanzen und Menschen .....	11
I.1.3 Caspasen – die wichtigsten Enzyme der apoptotischen Todesmaschinerie.....	12
I.1.4 Überblick über die apoptotische Signalkaskade im Säuger.....	13
I.1.5 Überblick über die Apoptose in <i>S. cerevisiae</i> .....	16
<b>I.2 Autophagozytose.....</b>	<b>21</b>
<b>I.3 Protein N-Glykosylierung .....</b>	<b>24</b>
I.3.1 Überblick über die eukaryotische N-Glykosylierung .....	24
I.3.2 Defekte in der N-Glykosylierung führen zu apoptotischen Phänotypen in <i>S. cerevisiae</i> .....	25
<b>I.4 Zielsetzung.....</b>	<b>28</b>
<b>II. Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>29</b>
<b>II.1 Defekte in der N-Glykosylierung induzieren programmierten         Zelltod in <i>S. cerevisiae</i> .....</b>	<b>30</b>
<b>II.1.1 Defekte N-Glykosylierung in <i>wbp1-1</i> führt zu apoptotischen                 Phänotypen .....</b>	<b>30</b>
II.1.1.1 Analyse von Caspaseaktivität <i>in vivo</i> und in zellfreien Extrakten .....	30
II.1.1.2 Nachweis von Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).....	36
II.1.1.3 Analyse der Mitochondrienmorphologie mittels konfokaler Mikroskopie.....	38

II.1.1.4	Fragmentierung der DNA durch defekte N-Glykosylierung .....	40
II.1.1.5	Reduktion reaktiver Sauerstoffspezies durch die Antioxidantien Glutathion und N-Acetyl-L-Cystein .....	43
II.1.1.6	Programmierter Zelltod ist abhängig von der Proteinneusynthese .....	46
II.1.1.7	Überexpression des humanen anti-apoptotischen Faktors <i>Bcl-2</i> .....	47
II.1.1.8	Osmotische Stabilisierung von <i>wbp1-1</i> durch Sorbit .....	49
II.1.2	Hemmung der N-Glykosylierung im Wildtyp durch Tunicamycin induziert PCD.....	53
II.1.2.1	Inkubation der Kulturen mit Tunicamycin induziert Caspaseaktivität, ROS-Akkumulation und PI-Färbung im Wildtyp SS328.....	53
II.1.2.2	Reduktion von Phänotypen des programmierten Zelltods durch Zusatz unterschiedlicher Additiva .....	54
II.1.2.3	Veränderung der Mitochondrienmorphologie nach Behandlung der Zellen mit Tunicamycin .....	55
II.2	Welche Gene spielen in der Signalkaskade des programmierten Zelltods ausgelöst durch defekte N-Glykosylierung eine Rolle? .....	57
II.2.1	Identifizierung von Proteinen, die den Wachstumsphänotyp in <i>wbp1-1</i> unterdrücken, mit Hilfe eines „Multi-copy Suppressor Screens“ .....	57
II.2.1.1	Auswertung des „Multi-copy Suppressor Screens“ .....	57
II.2.1.2	Übt Ost2p eine anti-apoptotische Funktion in der N-Glykosylierungs- mutante <i>wbp1-1</i> aus? .....	59
II.2.2	Analyse von Hefegenen, die Homologie zu humanen pro-apoptotischen Genen aufweisen.....	61
II.2.2.1	„Apoptosis Inducing Factor“ ( <i>AIFI</i> ).....	61
II.2.2.2	„NADH Dehydrogenase Internal“ ( <i>NDII</i> ).....	63
II.2.2.3	„Nuclear Mediator of Apoptosis“ ( <i>NMA111</i> ) .....	64
II.2.2.4	„Yeast Endoplasmic reticulum Transmembrane protein“ ( <i>YET2</i> ) .....	65
II.2.3	Welche Proteasen sind in die Signalkaskade des programmierten Zelltods involviert? .....	68
II.2.3.1	Identifikation von Proteasen durch einen Screen der Deletionsgenbankstämme nach Behandlung mit Tunicamycin .....	68
II.2.3.2	Disruption und Überexpression von <i>QRI7/YDL104C</i> beeinflussen den programmierten Zelltod in <i>wbp1-1</i> .....	70
II.3	Kex1p als Komponente der Signalkaskade des programmierten Zelltods in <i>S. cerevisiae</i> .....	74
II.3.1	Analyse apoptotischer Merkmale nach Disruption von <i>KEX1</i> , <i>KEX2</i> und <i>YCA1</i> in <i>wbp1-1</i> .....	74
II.3.1.1	Wachstumsverhalten und Unterglykosylierung der Carboxypeptidase Y in <i>wbp1-1Δkex1</i> .....	74
II.3.1.2	Analyse der Caspaseaktivität .....	76
II.3.1.3	Auswirkung der Disruptionen von <i>YCA1</i> , <i>KEX1</i> und <i>KEX2</i> in <i>wbp1-1</i> auf die ROS-Produktion.....	77

II.3.1.4	Untersuchung der Überlebensrate nach Disruption von <i>KEX1</i> und <i>KEX2</i> .....	78
II.3.1.5	Veränderung der Zellmorphologie in <i>wbp1-1</i> nach Induktion des programmierten Zelltods.....	79
II.3.1.6	Reduktion der Mitochondrienfragmentierung in <i>wbp1-1Δkex1</i> .....	80
II.3.2	Beteiligung von Kex1p am programmierten Zelltod ausgelöst durch weitere Stressfaktoren .....	81
II.3.2.1	Reduktion apoptotischer Merkmale durch Disruption von <i>KEX1</i> und <i>KEX2</i> nach Inhibition der N-Glykosylierung durch Tunicamycin.....	81
II.3.2.2	Verlängerung der Lebensspanne in <i>Δkex1</i> im Vergleich zum Wildtyp .....	82
II.3.2.3	Deletion von <i>KEX1</i> reduziert apoptotische Phänotypen nach Induktion von Apoptose mittels Essigsäurestress .....	83
II.3.3	Auswirkungen der Kex1p Überexpression in <i>wbp1-1</i> .....	85
II.4	Die Rolle der Autophagozytose im programmierten Zelltod ausgelöst durch einen Defekt in der N-Glykosylierung .....	89
II.4.1	Transkriptionelle Regulation autophagozytotischer Gene in <i>wbp1-1</i> .....	89
II.4.2	Analyse apoptotischer Marker nach Disruption von Autophagozytosegenen in <i>wbp1-1</i> .....	93
II.4.3	Untersuchung apoptotischer Phänotypen nach Deletion von Autophagozytosegenen im Wildtyp.....	96
II.4.4	Auswirkung der Disruption von <i>UTH1</i> auf Phänotypen des programmierten Zelltods .....	98
II.5	„Unfolded Protein Response“ und Apoptose .....	101
II.5.1	Genregulation durch den UPR .....	101
II.5.2	Auswirkungen eines nicht funktionellen Kar2p auf Defekte in der N-Glykosylierung .....	104
II.5.3	Konsequenzen der Disruption von <i>IRE1</i> und <i>HAC1</i> .....	106
III.	Zusammenfassung .....	108
III.1	Durch eine defekte N-Glykosylierung wird ein Selbstmordprogramm in Hefe induziert .....	109
III.2	Identifizierung von Proteinen, die in die Signalkaskade des programmierten Zelltods involviert sind.....	111
IV	Materialien .....	114
IV.1	Verwendete Geräte .....	114
IV.2	Chemikalien und Zubehör .....	114
IV.3	Kits .....	116
IV.4	Antikörper .....	116
IV.5	Verwendete Organismen .....	116

IV.5.1 <i>E. coli</i> .....	116
IV.5.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	116
IV.6 Plasmide .....	117
IV.7 Oligonukleotide .....	118
<b>V. Methoden .....</b>	<b>122</b>
<b>V.1 Anzuchtbedingungen, Medien und Dauerkulturen .....</b>	<b>122</b>
V.1.1 <i>E. coli</i> .....	122
V.1.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	122
<b>V.2 Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>124</b>
V.2.1 Theoretische Grundlagen .....	124
V.2.1.1 Durchflußzytometrie und FACS-Analyse .....	124
V.2.1.2 Konfokale Mikroskopie .....	126
V.2.2 Anzucht und Behandlung der Zellen für die Durchflußzytometrie, FACS-Analyse und konfokale Mikroskopie .....	126
V.2.3 Färbung und Vorbereitung der Zellen für Untersuchungen mittels Durchflußzytometrie, FACS-Analyse und konfokaler Mikroskopie .....	127
V.2.4 Kulturvorbereitung für Wachstumstests (Tüpfeltest) .....	128
<b>V.3 Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>129</b>
V.3.1 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	129
V.3.1.1 Analytischer Verdau .....	129
V.3.1.2 Präparativer Verdau (Insert, Vektoren) .....	129
V.3.2 Subklonierung in pUC19 und pBS .....	129
V.3.3 Herstellung chemisch kompetenter Zellen .....	129
V.3.4 Transformation und Selektion in <i>E. coli</i> .....	130
V.3.5 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> .....	130
V.3.6 Amplifizierung der Hefegenbank .....	131
V.3.7 Hefetransformation .....	131
V.3.8 Transformation von <i>wbp1-1</i> mit der Genbank .....	132
V.3.9 Isolierung genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i> .....	132
V.3.10 Plasmidisolierung aus <i>S. cerevisiae</i> .....	132
V.3.11 Plasmidisolierung aus <i>S. cerevisiae</i> (STET) .....	133
V.3.12 Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	133
<b>V.4 Proteinbiochemische Methoden .....</b>	<b>134</b>
V.4.1 Zellaufschluss .....	134
V.4.1.1 Alkalische Lyse .....	134

V.4.1.2 Glasperlenaufschluss .....	134
V.4.1.3 Glasperlenaufschluss Merckenschlager (großer Maßstab) .....	135
V.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	135
V.4.3 Mitochondrienisolierung .....	135
V.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	136
V.4.5 Western-Blot.....	136
V.4.6 Radioaktive Markierung der Carboxypeptidase Y mit [ <sup>35</sup> S]- Methionin/Cystein.....	137
V.4.7 Caspaseaktivitätstest.....	138
V.4.8 Kex1p Aktivitätstest.....	139
V.4.8.1 Messung des FA-Ala-Arg-OH Umsatzes in einer spektrophotometrischen Analyse .....	139
V.4.8.2 Messung des Ac-VEID-AMC Umsatzes in einer fluorimetrischen Analyse ..	140
V.4.9 Transkriptomanalyse.....	140
V.4.9.1 Theoretische Grundlagen und Auswertung der Transkriptomanalyse.....	140
V.4.9.2 Anzucht der Zellen .....	141
V.4.9.3 RNA-Isolierung und Weiterverarbeitung im Kompetenzzentrum .....	141
Abbildungsverzeichnis .....	143
Tabellenverzeichnis .....	145
<b>VII. Referenzen .....</b>	<b>146</b>

# Abkürzungen

Ac-DEVD-AFC	<i>N</i> -Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-Amino-4-Trifluoromethyl-coumarin
Ac-IETD-AFC	<i>N</i> -Acetyl-Ile-Glu-Tyr-Asp-7-Amino-4-Trifluoromethylcoumarin
Ac-VEID-AMC	<i>N</i> -Acetyl-Val-Glu-Ile-Asp-7-Amino-4-Methylcoumarin
Ac-YVAD-AFC	<i>N</i> -Acetyl-Tyr-Val-Ala-Asp-7-Amino-4-Trifluoromethylcoumarin
AIF1	apoptosis inducing factor
APAF-1	apoptotic protease activating factor
ATG	autophagy related
Bad	Bcl-2 agonist of cell death
Bax	Bcl-2 associated X-factor
Bcl-2	B cell lymphoma 2
Bid	BH3 interacting domain death agonist
CARD	caspase recruitment domain
Caspase	cysteiny l aspartate-specific proteinase
CDC48	cell division cycle (mutant) 48
CED	<i>Caenorhabditis elegans</i> death
CH	Cycloheximid
CPY	Carboxypeptidase Y
Cyt C	Cytochrom <i>c</i>
Cvt	cytosol to vacuole transport
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DD	death domain
DED	death effector domain
DHR123	Dihydrorhodamin 123
DISC	death inducing signaling complex
D <sub>2</sub> R	(Asp) <sub>2</sub> Rhodamine 110
DTT	Dithiothreitol



ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERAD	endoplasmatic reticulum associated degradation
FITC	Fluoroisothiocyanat
FITC-VAD-FMK	Fluoroisothiocyanat-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketon
FA-Ala-Arg-OH	Furylacryloyl-alanyl-arginin
GFP	green fluorescent protein
GSH	Glutathion
H <sub>2</sub> DCFDA	2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HtrA2	high temperature requirement A2
IAP	inhibitor of apoptosis
ICE	interleucin-1 $\beta$ -converting enzyme
kDa	Kilodalton
NAC	N-acetyl-L-cystein
NMA111	nuclear mediator of apoptosis
OD	Optische Dichte
ORF	open reading frame
OST	N-Oligosaccharyltransferase
PBS	phosphat buffered saline
PCD	programmed cell death
PI	Propidiumjodid
RFP	red fluorescent protein
ROS	reactive oxygen species
TM	Tunicamycin
TUNEL	terminal transferase dUTP nick end labeling
TS	Temperaturshift
ÜN	über Nacht
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis
YCA1	yeast caspase-1
YET	yeast endoplasmic reticulum transmembrane protein
zVAD-FMK	Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketon

# I. Einleitung

In den letzten Jahren wurden im Säuger immer mehr unterschiedliche Formen des Zelltods identifiziert, die sich in ihren morphologischen Kriterien, wenn auch manchmal nicht in hohem Maße, voneinander unterscheiden. Neben den bekannten Definitionen wie Apoptose und Nekrose erschienen in der Literatur auch Begriffe wie „apoptosis-like programmed cell death“, „necrosis-like programmed cell death“ oder „accidental necrosis“ (Leist und Jaattela, 2001). In dem nachfolgenden Abschnitt werden diese und weitere Bezeichnungen für das Absterben von Zellen nach neuestem Verständnis näher definiert.

Der Begriff Apoptose (*apo* – von, *ptosis* – fallen), der aus dem Griechischen stammt und ursprünglich in einem Gedicht verwendet worden war, um im Herbst den Vorgang des Blattabwerfens zu beschreiben, wurde im Jahre 1972 von Kerr, Wyllie und Currie zur Abgrenzung gegenüber Nekrose geprägt (Kerr *et al.*, 1972). Apoptose zeichnet sich durch morphologische Veränderungen der Zelle wie Chromatinkondensation, Phosphatidylserintranslokation von der inneren Schicht der Plasmamembran auf die äußere Schicht, cytoplasmatisches Schrumpfen der Zelle, Formierung von so genannten „apoptotic bodies“ (apoptotische Vesikel), die neben cytosolischen Bestandteilen auch Fragmente des Nukleus enthalten, und durch die Aktivierung der proteolytischen Effektoren, den Caspasen („cysteiny-**asp**artate-cleaving prote**as**es“), aus. Apoptose und die im Folgenden aufgeführten Formen des programmierten Zelltods unterscheiden sich neben den genannten Merkmalen auch durch ihre genetische Determinierung von nicht programmiertem, nekrotischem Zelltod. Neben Apoptose wurde eine weitere Form des „programmed cell death“ (PCD) beschrieben, der so genannte „apoptosis-like PCD“. Dieser grenzt sich insofern von Apoptose ab, dass keine Caspaseaktivität nachgewiesen werden konnte, obwohl sämtliche andere apoptotische Phänotypen präsent waren. Im Ergebnisteil dieser Arbeit wurde der Einfachheit halber neben dem Begriff „programmierter Zelltod“ auch „Apoptose“ verwendet, wobei man hier eher von „Apoptose-ähnlichem programmierten Zelltod“ sprechen sollte. Neben den oben genannten Begriffen sollte auch noch der „necrosis-like PCD“ genannt werden, der sich von den beiden beschriebenen Zelltodarten durch das Fehlen von Chromatinkondensation auszeichnet und im Regelfall ohne eine Aktivierung von Caspasen durchgeführt wird (Leist und Jaattela, 2001). Eine weitere Kategorie des programmierten Zelltods stellt die Autophagozytose dar. Die dabei auftretenden cytoplasmatischen Vesikel, so genannte Autophagosomen, wurden erstmals 1957 als „large round bodies“ in elektronenmikroskopischen Aufnahmen identifiziert (Clark, 1957). Typische Merkmale dieser Form des Zelltods, bei der es zu keiner Chromatinkondensation kommt, ist die unspezifische Aufnahme von Cytosol in

Autophagosomen und die Neuverteilung des Fusionsproteins LC3-GFP. LC3 ist ein humanes Protein und zu Atg8p in Hefe homolog. Beide lokalisieren normalerweise im Cytosol, wobei sie nach Induktion von Autophagozytose an der Vakuolen- und Autophagosomenmembran detektiert werden können (Kroemer *et al.*, 2005). Im Gegensatz zum programmierten Zelltod, der wie schon erwähnt genetisch determiniert ist, ist das nekrotische Absterben der Zelle ein Ereignis, das unabhängig vom Zellstoffwechsel abläuft und nur durch Beseitigung extrazellulärer Nekrose induzierender Stimuli wie Detergentien, Oxidantien oder Ionophore unterbunden werden kann. Nekrose ist durch ein Anschwellen der Organelle und letztendlich durch das Platzen der Zelle charakterisiert, wobei die typische nekrotische Morphologie des Gewebes und der Zellen größtenteils erst nach der Ruptur der Plasmamembran, also nach dem eigentlichen Zelltod, zu identifizieren ist (Leist und Jaattela, 2001).

# I.1 Apoptose

## **I.1.1 Programmierter Zelltod/Apoptose – ein historischer Überblick**

Programmierter Zelltod wurde zum ersten Mal von C. Vogt im Jahre 1842 als morphologische Veränderung bestimmter Zellen während der Entwicklung von Amphibien beschrieben. Doch erst mehr als 40 Jahre später wurden apoptotische Zellen unter anderem von W. Flemming und M. Heidenhain identifiziert, die der Beschreibung nach der heutigen Auffassung von Apoptose entsprachen. Zu dieser Zeit waren die Forscher aufgrund der geringen Vergrößerung der damaligen Mikroskope in ihrer Arbeit limitiert, was sich aber in den 60er Jahren nach Entwicklung von Transmissionselektronenmikroskopen schlagartig änderte. Nachdem J. Saunders lange vor seiner Publikation „Death in embryonic systems“ ein reproduzierbares Muster an absterbenden Zellen in Hühnerembryonen identifizieren konnte (Saunders, 1966), wurde von C. Williams eine Arbeit mit dem Titel „Programmed Cell Death“ (PCD) veröffentlicht, in der erstmals eine genetische Determinierung des Zelltods in Erwägung gezogen wurde (Lockshin und Williams, 1964). In den untersuchten sterbenden Zellen konnten immer wieder dieselben spezifischen Muster wie das Schrumpfen von Zellen, Chromatinkondensation und Fragmentierung der Zelle und des Nukleus identifiziert werden. Kerr, Wyllie und Currie argumentierten, dass diese Art des Zelltods ein organisierter und stark konservierter Mechanismus sein muss und betitelten diese Art des programmierten Zelltods „Apoptose“ (Kerr *et al.*, 1972). Ende der 60er Jahre konnte in drei Laboren unabhängig voneinander in unterschiedlichen Organismen und Geweben gezeigt werden, dass durch Hemmung der Proteinneusynthese Zelltod verhindert werden kann, wobei aufgrund der mangelnden Techniken keine genetischen Analysen durchgeführt werden konnten. Dies änderte sich abrupt nach der Entdeckung neuer molekulargenetischer Methoden und der Verwendung des Modellorganismus, *Caenorhabditis elegans*. J. Sulston und R. Horvitz entdeckten 1977, dass in *C. elegans* im Laufe der Entwicklung des Embryos zum adulten Tier von den 1090 gebildeten somatischen Zellen immer dieselben 131 Zellen apoptotisch absterben (Sulston und Horvitz, 1977) und identifizierten Gene, unter anderem *ced-3*, *ced-4* und *ced-9*, die für diesen Prozess essentiell waren (Horvitz *et al.*, 1983). Nach Sequenzierung von *ced-3* im Jahre 1993 konnte diesem eine Verwandtschaft zu Säugerproteasen nachgewiesen werden, was schließlich zur Identifizierung einer neuen Proteasefamilie, den Caspasen, führte (zusammengefasst in Lockshin und Zakeri, 2001). Zudem erhielten sie Hinweise für eine Signalkaskade des apoptotischen Zelltods, in dem die oben genannten Gene involviert waren und die, wie wir heute wissen, einer vereinfachten Form der Signalkaskade im Säuger entsprach.

## **I.1.2 Die Rolle der Apoptose bei Pflanzen und Menschen**

Wie wichtig dieses „Selbstmordprogramm“ der Zellen für Entwicklung und Erhaltung der unterschiedlichsten Organismen tatsächlich ist, wurde erst in den letzten Jahren aufgrund funktionell stark konservierter Proteine, die in der Signalkaskade des programmierten Zelltods mitwirken, richtig erkannt. Neben Säugerzellen, in denen die apoptotischen Signalkaskaden bereits ganz gut verstanden werden, konnten in dem einzelligen Organismus, der Bäckerhefe *S. cerevisiae* (Madeo *et al.*, 1997; Madeo *et al.*, 2002), und auch in den phylogenetisch vom Säuger noch weiter entfernten Pflanzenzellen (Bozhkov *et al.*, 2004; O'Brien *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1996) Apoptose kennzeichnende Phänotypen wie Metacaspaseaktivität, Translokation von Phosphatidylserin und Fragmentierung nukleärer DNA nachgewiesen werden. In Pflanzen zeigte sich eine Involvierung des programmierten Zelltods während der Reproduktion, aber auch während des vegetativen Wachstums, zum Beispiel bei der Bildung des Xylems (Fukuda, 1997) und bei der Seneszenz von peripheren Zellen der Wurzelhaube und von Blättern (Gan und Amasino, 1997; Zhu und Rost, 2000). Auch spielt programmierter Zelltod in Pflanzen nach Pathogenbefall eine wichtige Rolle. Nach Infektion der Pflanze durch einen Schädling kann es zum so genannten „hypersensitive response“ kommen, was letztendlich zum nekrotischen Absterben des Gewebes um die infizierten Zellen führt, wobei es Hinweise gibt, dass dies genetisch determiniert ist (Khurana *et al.*, 2005).

Wie oben erwähnt, konnten bei der Erforschung der apoptotischen Signalkaskaden im Menschen in den letzten Jahren gute Fortschritte gemacht werden. Die intensive Forschung auf diesem Gebiet ist auf die Erkenntnis zurückzuführen, dass apoptotische Prozesse in einer Vielzahl von Krankheiten eine wichtige Rolle einnehmen. Im menschlichen Organismus werden pro Sekunde etwa 100.000 Zellen neu gebildet, wobei dieselbe Anzahl an Zellen auch wieder programmiert absterben muss, um das Gleichgewicht zwischen Neubildung und Eliminierung aufrecht zu erhalten. Falls dies durch Hemmung oder Erhöhung der Apoptoserate nicht gewährleistet ist, kann es zum Auftreten der verschiedensten Krankheitsbilder kommen, unter anderem zu malignen Tumoren, Autoimmunerkrankungen, viralen Infektionen und chronischen Entzündungsreaktionen (bei Hemmung) oder zu neurodegenerativen Erkrankungen, bakteriellen Infektionen und Ischämie (bei Erhöhung) (zusammengefasst in Fadeel und Orrenius, 2005). Um die exakten Mechanismen der apoptotischen Signalkaskade im Menschen und in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* besser zu verstehen, wird in den nachfolgenden Kapiteln detaillierter auf die bis jetzt entschlüsselten Komponenten und Kaskaden des programmierten Zelltods eingegangen.

### **I.1.3 Caspasen – die wichtigsten Enzyme der apoptotischen Todesmaschinerie**

Caspasen gehören der Familie der „cysteiny **asp**artate protein**ases**“ an. Sie sind in der Evolution stark konserviert und konnten unter anderem in Menschen, Mäusen, Hühnern, Fischen, Amphibien, Insekten und Nematoden nachgewiesen werden. Die Entdeckung von Mitgliedern dieser Proteasefamilie startete, nachdem CED-3 als essentielles Protein für die Induktion des Zelltods in *Caenorhabditis elegans* identifiziert worden war. Die erste Caspase, die aufgrund der Verwandtschaft zu CED-3 im Säuger entdeckt wurde, war das „interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme“ (genannte ICE oder Caspase-1) (Thornberry *et al.*, 1992). Die katalytische Eigenschaft dieser Proteasefamilie war namensgebend. Caspasen verwenden eine Cysteinseitenkette für die katalytische Spaltung der Substrate, was unter Proteasen nicht ungewöhnlich ist. Die Besonderheit dieser Proteasefamilie liegt vielmehr in ihrer Substratspezifität, die sich darauf begründet, dass Substrate nur nach einem Aspartat-X Motiv gespalten werden (Alnemri *et al.*, 1996). Caspasen liegen im Cytosol als Zymogene vor, die durch mindestens zwei proteolytische Spaltungen aktiviert werden. Zum einen wird die N-terminale Prodomäne, die abhängig von der Caspase eine Größe von 30–50 kDa aufweist, von der großen Untereinheit (20 kDa) und die große Untereinheit von der C-terminalen kleineren Untereinheit (10 kDa) abgespalten. Nach Bildung eines Heterodimers aus zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten hat die Caspase ihre aktive Form erreicht und ist nun in der Lage die entsprechenden Substrate zu spalten (Thornberry und Lazebnik, 1998). Im Jahre 2000 konnten weitere zur Caspasefamilie evolutionär verwandte Proteasefamilien, die Metacaspasen (in Pflanzen, Pilzen und Protozoen) und Paracaspasen (in Metazoen und *Dictyostelium*) identifiziert werden (Uren *et al.*, 2000). Beide besitzen eine den Caspasen ähnliche proteolytische Domäne, die über zwei stark konservierte Aminosäuren verfügt, Cystein und Histidin.

Die Mitglieder der Caspasefamilie können aufgrund ihrer Substratspezifität, ihrer Sequenzhomologie und ihrer Funktion in drei Untergruppen eingeteilt werden (Thornberry, 1997): in die Gruppe der Initiatorcaspasen (Caspase-2, -8, -9 und -10) und die Gruppe der Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7). Beide spielen bei der Induktion und Ausführung der Apoptose eine Rolle. Die dritte Gruppe von Caspasen (Caspase-1, -4, -5, -11, -12, -13 und -14) ist nicht in die Apoptosemaschinerie involviert. Vielmehr werden diese Proteasen bei der Aktivierung von Cytokinen benötigt und sind somit an Entzündungsreaktionen beteiligt. Beispiele für die unterschiedliche Aktivierung von Caspasen sind in Abbildung I.1 gezeigt, die ein Schema des intrinsischen und extrinsischen Signalwegs der apoptotischen Kaskade darstellt. Hieraus geht hervor, dass es durch die Aktivierung der Effektorcaspasen durch die Initiatorcaspasen zu einer Amplifizierung des ursprünglichen Todessignals kommt.

Wie oben erwähnt zeichnet sich die Familie der Caspasen durch hohe Substratspezifität aus. Bis heute konnten mehr als 280 verschiedene Caspasesubstrate identifiziert werden, die sich in einige

wenige Kategorien unterteilen lassen. Die Proteine sind beteiligt am Aufbau und der Erhaltung des cytoplasmatischen und nukleären Grundgerüsts, an der Signaltransduktion und an der Regulation der Transkription, an der Kontrolle des Zellzyklus, an der DNA-Replikation und DNA-Reparatur (zusammengefasst in Fischer *et al.*, 2003). Um die Auswirkungen der Substratspaltung zu verdeutlichen soll nachfolgend detaillierter auf zwei Caspasesubstrate eingegangen werden. Ein typischer morphologischer Phänotyp der Apoptose ist die Fragmentierung von nukleärer DNA. 2003 konnte die dafür verantwortliche Nuklease identifiziert werden und wurde demzufolge „caspase activated DNase“ (CAD) genannt. In gesunden Zellen ist CAD im Cytosol mit seinem Inhibitor („inhibitor of CAD“, ICAD) assoziiert, so dass keine Fragmentierung der DNA durchgeführt werden kann. Nach Induktion der apoptotischen Signalkaskade und Aktivierung der Caspase-3 wird ICAD von dieser durch proteolytische Spaltung inaktiviert, was zur Dissoziation von ICAD von CAD führt. Dadurch wird die jetzt aktive Form von CAD in den Nukleus transportiert, wo sie nun die apoptotische DNA-Fragmentierung durchführen kann (Enari *et al.*, 1998). Weitere Substrate für Caspasen finden sich unter den regulatorischen Proteinen der apoptotischen Signalkaskade, z.B. APAF-1, XIAP oder Mitglieder der *Bcl-2* Familie. Beispielsweise wird Bid durch die Initiator-caspase-8 im Cytosol gespalten, wodurch das verkürzte Protein zur Mitochondrienmembran transloziert und dort den Ausstrom von Cytochrom *c* vom mitochondriellen Intermembranbereich ins Cytosol initiiert (siehe Abbildung I.1) (Li *et al.*, 1998). Ebenso führt die Abspaltung der BH4 Domäne in zwei klassische Apoptoseinhibitoren, *Bcl-2* und *Bcl-x<sub>L</sub>*, nicht nur zu deren Inaktivierung, vielmehr werden die Proteine anschließend zur äußeren mitochondrialen Membran transportiert, wo sie aktiv bei deren Permeabilisierung mitwirken (Cheng *et al.*, 1997; Clem *et al.*, 1998).

### **I.1.4 Überblick über die apoptotische Signalkaskade im Säuger**

Bis heute konnten in Säugerzellen zwei Caspase abhängige Signalwege identifiziert werden, die zur Induktion der apoptotischen Signalkaskade führen (zusammengefasst in Fulda und Debatin, 2006). Der so genannte extrinsische Signalweg wird durch die Bindung eines Liganden an den entsprechenden Oberflächenrezeptor initiiert. Diese Rezeptoren, darunter CD95 (auch bekannt als APO-1 oder Fas) und TNF-Rezeptor-1 („tumor necrosis factor receptor“), gehören zur Superfamilie der TNF-Rezeptoren (Smith *et al.*, 1994). Sie zeichnen sich durch eine sich 2 bis 6 mal wiederholende Cystein-reiche extrazelluläre Domäne aus, die innerhalb der Mitglieder dieser Familie stark konserviert ist. Ebenso besitzen beide Rezeptoren eine etwa 80 Aminosäuren lange homologe cytoplasmatische Domäne, die als „death domain“ (DD) bezeichnet wird und das extrazelluläre „Todessignal“ von der Zelloberfläche zur intrazellulären Signalkaskade transduziert. Nach Bindung der spezifischen Liganden an den entsprechenden Rezeptor kommt es zur Rezeptortrimerisierung und zu einer damit verbundenen Exposition der „death domain“. An diese DD kann das Protein FADD

(„Fas-associating protein with death domain“), das am C-terminalen Ende ebenso über eine DD verfügt, binden, wobei diese Assoziation durch Interaktion beider Todesdomänen zustande kommt (Chinnaiyan *et al.*, 1995). Der N-Terminus von FADD besteht aus einer so genannten „death effector domain“ (DED), die für die anschließende Weiterleitung des Signals verantwortlich ist. 1996 konnte schließlich mit der Caspase-8 (auch FLICE genannt von „FADD-like ICE“) ein Protein identifiziert werden, das die Fähigkeit besitzt, an diese Domäne zu binden (Boldin *et al.*, 1996). Die Caspase-8

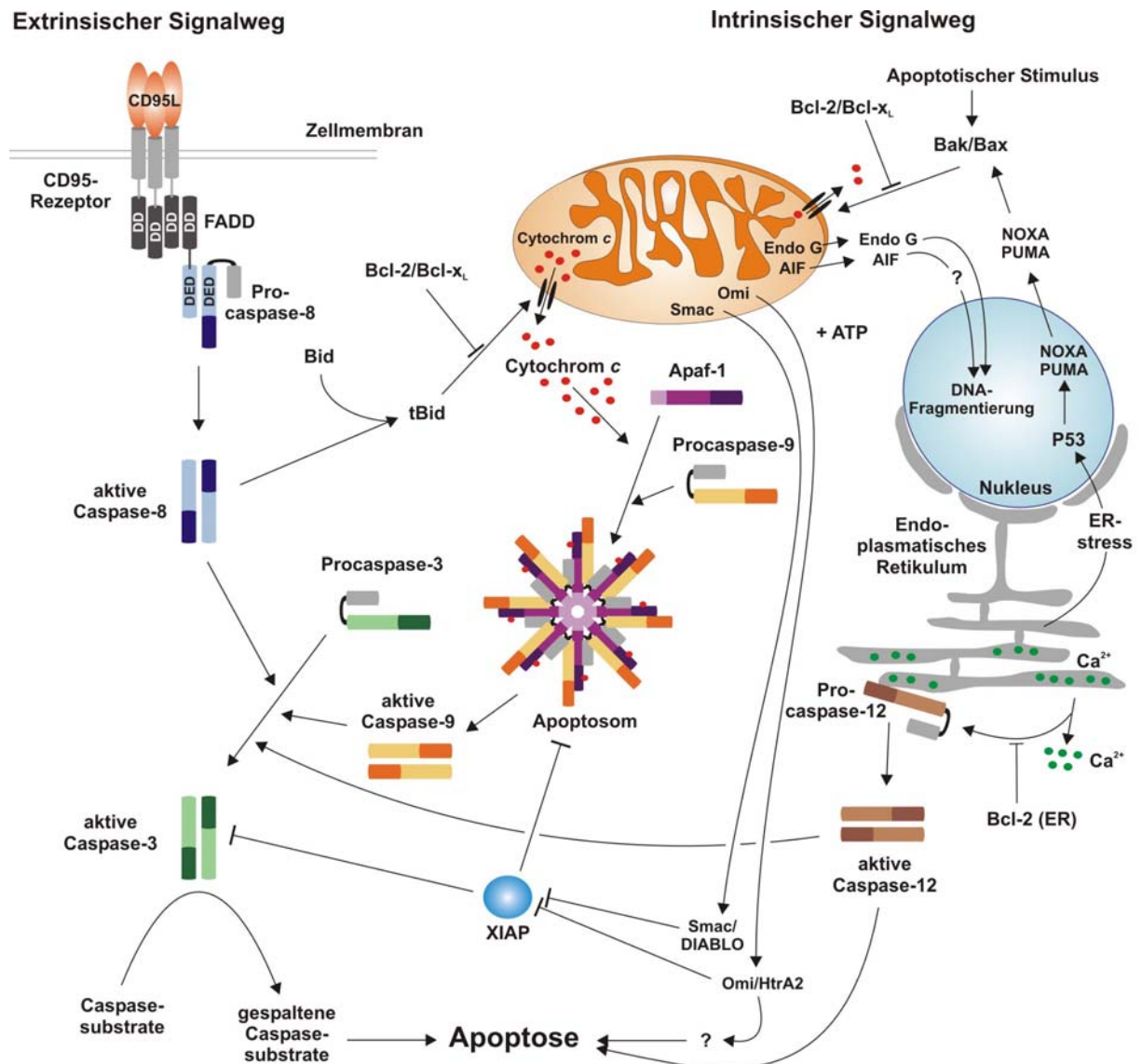


Abbildung 1.1: Die intrinsische und extrinsische Signalkaskade der Apoptose im Säuger.

liegt im Cytosol als Zymogen vor und wird durch Interaktion mit den Fas- oder TNF-R1-Rezeptor-komplexen durch autokatalytische Spaltung und einer davon gefolgt Oligomerisierung in den aktiven Zustand überführt. Dieser Komplex wird als DISC-Komplex („death-inducing signaling complex“) bezeichnet. In dieser Form ist die Caspase-8 in der Lage die inaktive Version der Effektorcaspase-3 proteolytisch zu aktivieren und dadurch die apoptotische Signalkaskade durch



Spaltung zahlreicher Caspasesubstrate (Abb. I.1) in Gang zu setzen. Ein weiteres Substrat der Caspase-8 ist Bid, ein pro-apoptotisches Mitglied der *Bcl-2*-Familie. Dieses Protein liegt normalerweise als inaktive Form im Cytosol vor (Bid, 22 kDa), kann aber durch die Rezeptor-vermittelte Aktivierung der Caspase-8 in seine verkürzte, aktive Form umgewandelt werden (tBid, 15 kDa). Anschließend transloziert tBid vom Cytosol zu den Mitochondrien, wo es in die mitochondrielle Membran integriert (Li *et al.*, 1998). Dort interagiert es mit den pro-apoptotischen Proteinen Bax und Bak und induziert deren Oligomerisation, was zu einer Veränderung in der Durchlässigkeit der äußeren mitochondriellen Membran, genannt „**mitochondrial outer membrane permeabilization**“ (MOMP), und letztendlich zur Translokation pro-apoptotischer Faktoren, wie Cytochrom *c* oder AIF, aus dem mitochondriellen Intermembranbereich ins Cytosol führt (Esposti, 2002). Dieser Schritt zeigt, wie der extrinsische Signalweg mit dem intrinsischen interagieren kann.

Der intrinsische Signalweg unterscheidet sich vom extrinsischen insofern, dass hier für die Induktion der apoptotischen Signalkaskade kein extrazellulärer Stimulus zwingend notwendig ist. Dagegen ist der Tumor Suppressor p53, der durch direkte Aktivierung von Bax und Bak Membranpermeabilisierung auslösen kann, in der Lage, nach Schädigung der DNA die intrinsische Signalkaskade zu induzieren (zusammengefasst in Green und Kroemer, 2004). Nach Disruption der äußeren mitochondriellen Membran konnten einige pro-apoptotische Proteine identifiziert werden, darunter Cytochrom *c*, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, AIF1 und Endonuklease G, die ins Cytosol translozieren und dort die Aktivierung von Caspasen fördern oder Apoptose in einem Caspase-unabhängigen Signalweg induzieren. Im Cytosol bindet Cytochrom *c* an die C-terminale Region des cytosolischen Proteins APAF-1 („**apoptotic protease activating factor**“), das am N-Terminus über eine „**caspase-recruitment domain**“ (CARD) verfügt, die aufgrund der Cytochrom *c* Bindung freigelegt wird. An diese Domäne bindet die inaktive Procaspase-9, die anschließend in diesem so genannten Apoptosom-Komplex durch autokatalytische Spaltung in die aktive Caspase-9 umgewandelt wird (Li *et al.*, 1997). Diese spaltet die Procaspase-3 was wiederum zur Apoptoseinduktion führt. Zwei weitere Proteine des mitochondriellen Intermembranbereichs, Smac/DIABLO („**second mitochondrial activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI**“) und Omi/HtrA2 (**high temperature requirement A 2**), wurden als negative Regulatoren von XIAP („**X-linked IAP**“), einem Mitglied der „**inhibitor of apoptosis**“ (IAP) Familie identifiziert (Verhagen *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2002). IAPs sind durch eine 70 bis 80 Aminosäuren lange „**baculoviral IAP repeat**“ (BIR) Domäne gekennzeichnet, die für ihre anti-apoptotische Funktion durch Interaktion mit den Caspasen-3, -7 und -9 essentiell ist. XIAP ist dadurch beispielsweise in der Lage die Caspasen-3 und -7 mit Ubiquitin zu markieren und dadurch deren Degradation im Proteasom zu fördern, was eine Reduktion der Apoptose nach sich zieht. Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 führen nach Freisetzung aus dem Mitochondrium indirekt durch Hemmung von IAPs zur Aktivierung von Caspasen. Im Gegensatz zu Cytochrom *c*, Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 führen die anderen beiden genannten pro-apoptotischen Proteine des mitochondriellen Membranbereichs, AIF und Endonuklease G, zur Induktion von Caspase-

unabhängigen programmierten Zelltod. Beide Proteine translozieren vom Cytosol in den Zellkern, wo sie DNA-Fragmentierung induzieren (Li *et al.*, 2001; Susin *et al.*, 1999).

In der letzten Zeit häuften sich die Hinweise, dass neben den Mitochondrien auch einem weiteren Organell, dem Endoplasmatischen Retikulum (ER), eine Rolle, wenn auch eine untergeordnete, bei der Induktion der Apoptose über die intrinsische Signalkaskade zukommt. Nach Induktion von ER-Stress (z.B. mittels Tunicamycin, einem N-Glykosylierungshemmstoff, durch Brefeldin A, das den Vesikeltransport vom ER zum Golgi-Apparat blockiert oder durch Thapsigargin, das die Calciumaufnahme in das ER durch Hemmung der „sarcoplasmic/endoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase“ (SERCA) inhibiert), konnte eine Aktivierung der Caspase-12 in Mäusen, die möglicherweise Bak/Bax abhängig verläuft (Scorrano *et al.*, 2003), und der Caspase-4 im Menschen nachgewiesen werden. Beide Caspasen sind an der cytoplasmatischen Seite der ER-Membran lokalisiert (Hitomi *et al.*, 2004a; Nakagawa *et al.*, 2000). Zudem konnte nach Induktion von ER-Stress in murinen Zellen eine Aktivierung der Effektorcaspase-3 durch die Caspase-12 nachgewiesen werden (Hitomi *et al.*, 2004b). Hierbei sollte erwähnt werden, dass die humane Caspase-12, deren Vorkommen im Menschen auf etwa 20% einer afrikanisch stämmigen Subpopulation beschränkt ist, keine Rolle in der apoptotischen Signalkaskade des Menschen spielt (Saleh *et al.*, 2004). Vielmehr scheint hier die Caspase-4 eine ähnliche Funktion wie die murine Caspase-12 inne zu haben, wobei der Beitrag der Caspasen am durch ER-Stress induzierten Zelltod sowohl vom Zelltyp als auch vom Entwicklungsstadium der untersuchten Zellen abhängig zu sein scheint (Li *et al.*, 2006a). Vor kurzem konnte ferner gezeigt werden, dass die Transkription der beiden „BH3-only“ Proteine PUMA und NOXA durch ER-Stress in einer von p53 abhängigen Art und Weise hochreguliert wird. Dies führt zur Aktivierung von Bak/Bax, die dadurch an die Mitochondrienmembran translozieren und dort, wie oben beschrieben, die Induktion der Apoptose über das Mitochondrium auslösen (Li *et al.*, 2006a).

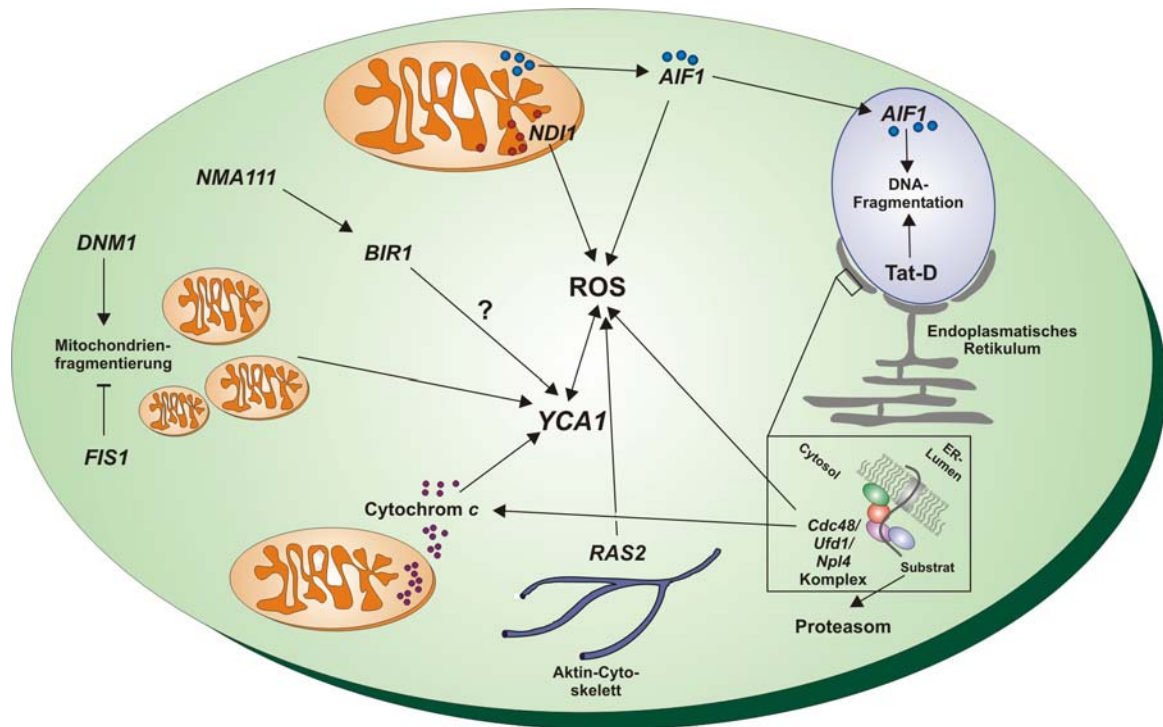
### **I.1.5 Überblick über die Apoptose in *S. cerevisiae***

Es wurde bereits erwähnt, dass apoptotische Phänotypen und Komponenten der apoptotischen Maschinerie in einer Vielzahl mehrzelliger Organismen nachgewiesen wurden. Auch konnte die Beteiligung des programmierten Zelltods während der Entwicklung und Aufrechterhaltung dieser Organismen und dessen Involvierung in unterschiedlichste Krankheitsformen aufgezeigt werden (siehe Kapitel I.1.2 und I.1.3). Nachdem nach Sequenzierung des Hefegenoms keine den Metazoen homologe apoptotische Gene in *S. cerevisiae* identifiziert werden konnten, schien diese Form des programmierten Zelltods in diesem Organismus nicht vorhanden zu sein, da es zudem nicht einleuchtend war, weshalb ein Einzeller „Selbstmord“ begehen sollte. Im Jahre 1997 wurden jedoch von Madeo *et al.* in einer *cdc48* Mutante typische apoptotische Merkmale wie Translokation von Phosphatidylserin von der inneren Schicht der Plasmamembran auf die äußere, DNA-Fragmentierung

und Chromatinkondensation entdeckt (Madeo *et al.*, 1997). Die Identifizierung von Apoptose in weiteren einzelligen Organismen, wie *Leishmania* (Lee *et al.*, 2002) oder *Trypanosoma* (Debrabant *et al.*, 2003), festigten die Hypothese einer genetischen Konservierung der Apoptosemaschinerie von der Bäckerhefe bis zum Menschen. Des Weiteren wurden in Hefe zum Säuger orthologe/homologe, in der apoptotischen Signalkaskade involvierte Proteine nachgewiesen (Fahrenkrog *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006b; Madeo *et al.*, 2002; Walter *et al.*, 2006; Wissing *et al.*, 2004). Diese Erkenntnisse führten dazu, dass der Modellorganismus *S. cerevisiae* von vielen Arbeitsgruppen zur grundlegenden Untersuchung der apoptotischen Signalkaskade verwendet wird.

Wie schon erwähnt, wurde Apoptose in der Bäckerhefe erstmals in Zellen identifiziert, die eine Punktmutation im *CDC48* Gen, das für eine AAA-ATPase kodiert, aufwiesen (Madeo *et al.*, 1997). Cdc48p ist neben Zellteilung und Vesikeltransport auch an der Retro-Translokation falsch gefalteter Proteine aus dem ER ins Cytosol beteiligt, die anschließend durch das Proteasom degradiert werden (Ye *et al.*, 2001). Vor kurzem stellte sich heraus, dass in dieser apoptotischen Signalkaskade neben den oben genannten apoptotischen Phänotypen auch Mitochondrien eine wichtige Rolle einnehmen, da in diesen mutierten Zellen Cytochrom *c* Translokation und ROS-Produktion nachgewiesen werden konnten (Braun *et al.*, 2006) (Abb. I.2). Obwohl in Hefe nach Sequenzierung des Genoms keine homologen apoptotischen Gene gefunden wurden, konnte durch heterologe Expression des humanen pro-apoptotischen Faktors Bax Apoptose ausgelöst werden, was durch Cytochrom *c* Ausstrom aus Mitochondrien, DNA-Fragmentierung, Chromatinkondensation und PS-Translokation begleitet war. Co-Expression des humanen anti-apoptotischen Faktors *Bcl-x<sub>L</sub>* verhinderte diese morphologischen Veränderungen (Ligr *et al.*, 1998; Manon *et al.*, 1997). Da die Zellen nach heterologer Expression von Bax ähnliche apoptotische Phänotypen wie in Säugerzellen aufwiesen und durch Expression von *Bcl-x<sub>L</sub>* dies verhindert werden konnte, wurde gefolgert, dass in beiden Organismen ein während der Evolution konservierter, Zelltod auslösender Signalweg vorhanden sein muss. Nach Intensivierung der Forschung im Bereich der Hefeapoptose konnten mehrere Proteine in Hefe ermittelt werden, die gewisse Homologie zu apoptotischen Regulatoren in höheren Eukaryoten aufwiesen. Dies waren „nuclear mediator of apoptosis“ Nma11p (Fahrenkrog *et al.*, 2004), „baculovirus IAP repeat protein“ Bir1p (Walter *et al.*, 2006), „apoptosis inducing factor“ Aif1p (Wissing *et al.*, 2004), „NADH dehydrogenase internal“ Ndi1p (Li *et al.*, 2006b), „dynamin-related protein“ Dnm1p, „mitochondrial fission protein“ Fis1p (Fannjiang *et al.*, 2004), Tat-D (Qiu *et al.*, 2005) und „yeast caspase-1“ Yca1p (Madeo *et al.*, 2002). Nma11p wurde als pro-apoptotisches Protein identifiziert, das nach Induktion von Zellstress mittels Temperaturerhöhung oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit dem „nuclear pore complex“ (NPC) interagiert. Im Gegensatz zum humanen Homologen OMI/HtrA2, das zunächst in den Mitochondrien lokalisiert ist und durch Induktion von Apoptose und einer damit verbundenen Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran ins Cytosol gelangt, kommt Nma11p im Cytosol und Nukleus vor (Fahrenkrog *et al.*, 2004). Die pro-apoptotische Funktion beider Proteine ist abhängig von deren katalytischer Serinprotease-Aktivität. OMI/HtrA2 stellt, sobald im Cytosol präsent, einen

Antagonisten von XIAP dar, was zur Aufhebung der hemmenden Wirkung gegenüber dem Apoptosom und letztendlich zur Aktivierung von Effektorcaspasen führt (Abb. I.1, Kapitel II.2.2.3). Auch für Nma111p wurde vor kurzem ein Substrat entdeckt, Bir1p, das Homologie zum anti-apoptotischen „survivin“ in Säugern aufweist. Nach Induktion von Apoptose wird Bir1p durch die



**Abbildung I.2: Grundlegende Bestandteile der apoptotischen Signalkaskade in *S. cerevisiae* (modifiziert nach Buttner et al., 2006).**

Serinprotease degradiert und verliert dadurch seine anti-apoptotische Fähigkeit (Walter *et al.*, 2006). Zwei weitere Schlüsselproteine der apoptotischen Signalkaskade in Hefe sind die zu AIF/AMID homologen Aif1p und Ndi1p, die beide pro-apoptotisch wirken. Aif1p transloziert ebenso wie das humane Homologe nach Permeabilisierung der Mitochondrienmembran vom Intermembranbereich in den Nukleus, was DNA-Degradation und Chromatinkondensation hervorruft. Im Gegensatz zum humanen AIF, das einen Caspase-unabhängigen Signalweg kontrolliert, scheint Aif1p in Hefe von der Hefecaspase, zumindest teilweise, abhängig zu sein (Wissing *et al.*, 2004) (Kapitel II.2.2.1). Im Gegensatz zu Aif1p bleibt Ndi1p auch nach Ruptur der Mitochondrienmembran in den Mitochondrien lokalisiert, da die NADH-Dehydrogenase an der Matrixseite der inneren Mitochondrienmembran assoziiert ist. Seine pro-apoptotische Wirkung wird auf eine starke Zunahme der ROS-Produktion im Mitochondrium bei Überexpression des Proteins zurückgeführt (Li *et al.*, 2006b) (Kapitel II.2.2.2). Dies zeigt, wie wichtig Mitochondrien für die Induktion der apoptotischen Signalkaskade sind. Ebenso konnte belegt werden, dass Defekte in der Teilungs- und Fusionsmaschinerie von Mitochondrien Auswirkungen auf programmierten Zelltod durch Translokation pro-apoptotischer Faktoren (z.B.

Aif1p, Nma1p und Cytochrom *c*) vom mitochondriellen Membranbereich ins Cytosol haben können. An diesen Prozess partizipieren die beiden Proteine Fis1p und Dnm1p (Fannjiang *et al.*, 2004). Wie oben erwähnt führt die Translokation von Aif1p in den Nukleus zu DNA-Fragmentierung und DNA-Degradation, wobei über den Mechanismus dieses Prozesses in Hefe bis jetzt noch nichts bekannt ist. Beim Durchsuchen des Hefegenoms nach Proteinen, die Homologie zu Nukleasen aus mehrzelligen Organismen aufwiesen, konnten acht Proteine identifiziert werden, die als apoptotische Nukleasen in Frage kamen. Von diesen konnte für die am stärksten konservierte Nuklease, Tat-D, eine Beteiligung an der apoptotischen Signalkaskade nachgewiesen werden (Qiu *et al.*, 2005) (Zusammenfassung über die homologen Gene in Frohlich *et al.*, 2007). Wie aus Abbildung I.2 hervorgeht, nimmt die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und die Hefecaspase-1 (*YCA1*) oft eine zentrale Rolle in der Apoptosemaschinerie der Bäckerhefe ein. Uren und seine Mitarbeiter entdeckten im Jahre 2000 eine in der Sekundärstruktur zu den humanen Caspasen homologe Proteinfamilie, die Metacaspasen, wobei hiervon auch ein Mitglied, Yca1p, in der Bäckerhefe vertreten war. Diese Protease ist in einige Signalkaskaden des programmierten Zelltods, ausgelöst durch verschiedene Stressstimuli oder Mutationen, involviert. Beispielsweise zeigten Zellen, die Wasserstoffperoxid (Madeo *et al.*, 2002), hyperosmotischen Stress (Silva *et al.*, 2005), Valproinsäure (Mitsui *et al.*, 2005) und Killertoxin (Ivanovska und Hardwick, 2005; Reiter *et al.*, 2005) ausgesetzt waren, Yca1p abhängige Apoptose. Dies konnte auch für alternde Kulturen bestätigt werden (Herker *et al.*, 2004). Auch führten Mutationen in *UBP10*, das für die Degradation von Proteine benötigt wird (Bettiga *et al.*, 2004), und in *LSM4*, das bei der Entfernung der Kappenstruktur am 5'-Ende der mRNA beteiligt ist (Mazzoni *et al.*, 2005) zu Caspase-abhängigen PCD. Es wurden jedoch auch *YCA1* unabhängige Wege des programmierten Zelltods identifiziert. Beispielsweise zeigten gealterte Zellen trotz *YCA1* Disruption Caspaseaktivität (Herker *et al.*, 2004; Vachova und Palkova, 2005). In *Afis1* Zellen wurde die Spaltung des humanen Caspasesubstrats DEVD, das nicht von Yca1p gespalten werden kann, nachgewiesen, wobei diese Aktivität bis jetzt noch keiner Protease zugeordnet werden konnte (Fannjiang *et al.*, 2004). Neben den oben genannten Beobachtungen konnte von S. Wissing gezeigt werden, dass ein durch Aif1p Überexpression induzierter Zelltod die Absterberate der Zellen zwar reduzierte, dies aber nicht vollständig revertierte, was eine nur teilweise Caspase-abhängige apoptotische Funktion von Aif1p impliziert (Wissing *et al.*, 2004).

Wie oben teilweise angesprochen, führt die Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Stressoren und Medikamenten, wie zum Beispiel Wasserstoffperoxid (Madeo *et al.*, 1999), Essigsäure (Giannattasio *et al.*, 2005; Ludovico *et al.*, 2001), NaCl (Huh *et al.*, 2002), hyperosmotischer Stress (Silva *et al.*, 2005), Osmotin (Narasimhan *et al.*, 2001) und Aspirin (Balzan *et al.*, 2004) zum Auftreten typischer apoptotischer Phänotypen. Außerdem konnte in einigen Mutanten PCD detektiert werden (zusammengefasst in Gourlay *et al.*, 2006; Madeo *et al.*, 2004).

Die Frage, warum ein einzelliger Organismus ein Selbstmordprogramm induzieren sollte, wurde in den letzten Jahren von vielen Skeptikern des Öfteren gestellt. Anfänglich konnte über die

physiologische Rolle der Apoptose in Hefe nur gemutmaßt werden, doch aufgrund aktueller Arbeiten wurde deren Bedeutung prägnanter. Ein erster Hinweis wurde von Hefezellen erhalten, die für mehrere Tage in flüssigem Medium kultiviert wurden, was als chronologisches Altern bezeichnet wird und apoptotisches Absterben der Zellen zur Folge hatte. Diese Zellen sonderten Moleküle mit niedriger molekularer Masse ab, die zwar isoliert, jedoch nicht identifiziert werden konnten. Die Zugabe dieser Substanzen zu chronologisch gealterten Zellen führte zu einer stark verbesserten Überlebensrate (Fabrizio *et al.*, 2004; Herker *et al.*, 2004). Ein ähnliches Phänomen konnte in Wachstumstest auf Agarplatten festgestellt werden. In der Kolonie zeigten vor allem die alten, im Zentrum der Kolonie lokalisierten Zellen apoptotische Phänotypen. Diese Zellen gaben Nährstoffe ab, was zu einem besseren Wachstum der jüngeren Zellen am Rande der Kolonie führte (Vachova und Palkova, 2005). Neben der Bereitstellung von Nährstoffen könnte der programmierte Zelltod in beiden Fällen noch eine weitere Funktion ausüben. Sowohl bei chronologisch gealterten Zellen als auch in alten Zellen einer Kolonie konnte neben ROS-Akkumulation auch eine Beschädigung der DNA nachgewiesen werden. Um zu verhindern, dass diese beschädigte DNA an die Nachkommen weitergegeben wird, macht es durchaus Sinn, einzelne Zellen durch Apoptose zu eliminieren, um nur das intakte Erbgut des Klons weiterzugeben. Aus dieser Perspektive betrachtet, sollte eine Hefekolonie weniger als eine Anhäufung von Einzelzellen, sondern vielmehr als multizellulärer Organismus aufgefasst werden, der in der Lage ist, Nährstoffe von geschädigten Nachbarzellen aufzunehmen und diese zum Wohle des „gesamten Organismus“ programmiert abzutöten (zusammengefasst in Gourlay *et al.*, 2006).

## I.2 Autophagozytose

Wie weiter oben bereits angesprochen wurde, kann der programmierte Zelltod anhand der auftretenden Merkmale in mehrere Kategorien unterteilt werden. (I) In Apoptose, (II) in „apoptosis-like PCD“, (III) in „necrosis-like PCD“ und (IV) in Autophagozytose, die seit neuestem auch als „autophagic PCD“ im Falle des programmierten Absterbens der betroffenen Zelle bezeichnet wird (Leist und Jaattela, 2001; Tsujimoto und Shimizu, 2005). Der Begriff Autophagozytose („autophagy“) leitet sich aus dem Griechischen ab und bedeutet wörtlich übersetzt „selbst“ oder „sich selbst“ („auto“) und „essen“ („phagy“). In der Zellbiologie wird der Begriff „Autophagozytose“ verwendet, um das Umschließen cytosolischer Komponenten zu beschreiben, wobei dieser Prozess genetisch determiniert ist. Zwei Formen der Autophagozytose können unterschieden werden, Mikro- und Makro-Autophagozytose. Bei Mikro-Autophagozytose, die im Vergleich zur Makro-Autophagozytose weniger gut charakterisiert ist, werden cytosolische Bestandteile durch Einstülpung der vakuolären Membran in das Lumen der Vakuole transportiert, wo diese Komponenten nach Zerstörung der Vesikelmembran degradiert werden. Da Makro-Autophagozytose eine weit wichtigere Rolle in den Zellen einzunehmen scheint, wird im Folgenden detaillierter auf deren Funktion und Wirkungsweise eingegangen. Der Einfachheit halber wird für Makro-Autophagozytose nachfolgend der allgemeinere Begriff Autophagozytose verwendet.

Während der Autophagozytose kommt es in der Zelle zur Reorganisation von Membranen (bis jetzt ist nicht bekannt, von welchem Kompartiment diese Membranen abstammen), was zur Bildung von Vesikeln mit Doppelmembranen führt, die als Autophagosomen bezeichnet werden (siehe Abb. I.3).

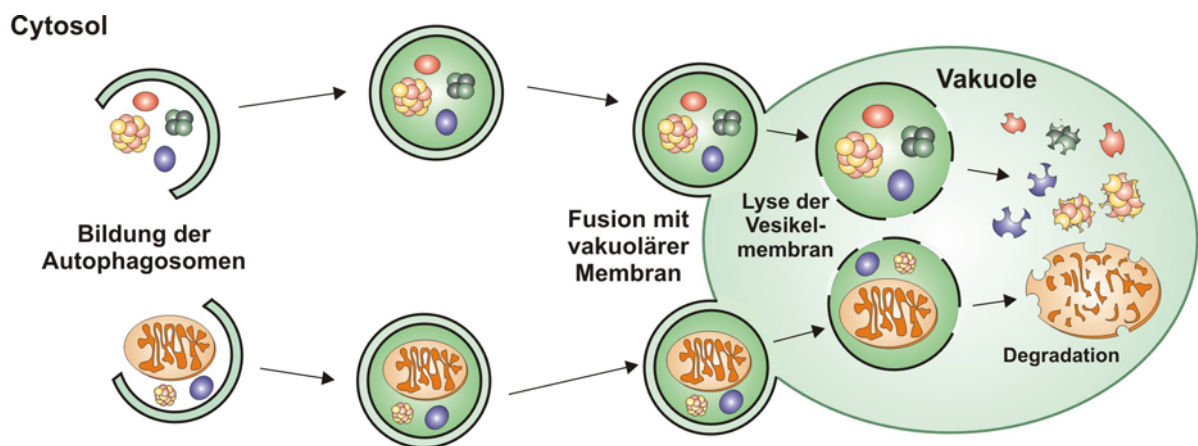


Abbildung I.3: Darstellung der Makro-Autophagozytose in *S. cerevisiae*.

Diese Vesikel werden im Cytosol gebildet und umschließen Teile des Cytosols, wobei hier auch ganze, im Cytosol vorhandene Organellen eingeschlossen werden können (falls Mitochondrien

eingeschlossen werden, spricht man auch von „mitophagy“). Anschließend werden die Vesikel zum Lysosom (Säuger) bzw. zur Vakuole (Hefe, Pflanzen) transportiert. Dort fusioniert die äußere Autophagosomenmembran mit der Membran der Vakuole. Diese Vesikel, die ab diesem Zeitpunkt nur noch von einer Membran umgeben sind und im Lumen der Vakuole lokalisieren, werden als „autophagic bodies“ (Autophagozytosekörperchen) bezeichnet. Die im Lumen der Vakuole präsenten Proteasen und Lipasen zerstören nun diese letzte Barriere und degradieren anschließend die im Autophagozytosekörperchen enthaltenen cytosolischen Komponenten und Organelle (zusammengefasst in Abeliovich und Klionsky, 2001).

Makro-Autophagozytose konnte in sämtlichen untersuchten Zelltypen, die einen Zellkern enthalten nachgewiesen werden und sie verläuft in den unterschiedlichsten Organismen, wie Hefen, Pflanzen und Säugern identisch ab. Obwohl die Morphologie der Autophagozytose erstmals in Säugerzellen beschrieben wurde, leistete der Modellorganismus *S. cerevisiae* einen wichtigen Beitrag bei der Identifizierung der molekularen Komponenten. Bis heute konnten 27 so genannte „autophagy-related“ (ATG) Gene in Hefesystemen identifiziert werden. Aufgrund der oft sehr uneinheitlichen Bezeichnung dieser Gene (z.B. APG, AUT und CVT) wurde für diese im Jahre 2003 eine einheitliche Nomenklatur veröffentlicht (Klionsky *et al.*, 2003). Da viele Gene, die für wichtige Komponenten der Autophagozytose kodieren, in verschiedenen Organismen (z.B. Hefen, Fliegen und Säugern) nachgewiesen werden konnten, scheint diese Art der Proteindegradation während der Evolution stark konserviert worden zu sein.

Wie oben angedeutet, werden seit kurzem zwei Arten von Autophagozytose diskutiert. Auf der einen Seite kann Autophagozytose durch Inkubation der Zellen in Mangelmedium, in dem beispielsweise essentielle Aminosäuren fehlen, induziert werden. Die Zelle reagiert darauf, indem sie im Lumen der Vakuole nicht essentielle cytosolische Bestandteile und alte Organelle in die einzelnen Bausteine degradiert, die anschließend von der Vakuole ins Cytosol zurücktransportiert und somit dem Stoffwechsel zur Erhaltung lebenswichtiger Prozesse zur Verfügung gestellt werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Autophagozytose bei Sauerstoffmangel, erhöhter Temperatur und bei Befall der Zelle durch Bakterien induziert werden kann (Ogawa *et al.*, 2005). Auch hier versucht die Zelle mittels Autophagozytose, diese Stresssituationen durch Bereitstellung neuer Grundbausteine, im Falle von Sauerstoffmangel und Temperaturstress, oder durch Liquidierung des Eindringlings (Bakterium) zu reduzieren. Auf der anderen Seite konnte auch ein autophagozytotischer programmierter Zelltod, allerdings nur unter Laborbedingungen nachgewiesen werden. Bei Behandlung von Säugerzellen mit cytotoxischen Agenzien wie Etoposid (Hemmstoff der Topoisomerase II) oder Staurosporin (Hemmstoff von Proteinkinasen) wird normalerweise Apoptose induziert. Falls dieser Signalweg jedoch durch Überexpression der anti-apoptotischen Proteine *Bcl-2* oder *Bcl-x<sub>L</sub>*, durch das Fehlen der pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak oder durch Zusatz des Pancaspaseinhibitors zVAD-FMK gehemmt wird, konnte programmierter Zelltod, der durch Autophagozytose exekutiert wurde, nachgewiesen werden. Da diese Art des programmierten Zelltods



jedoch nur unter nicht physiologischen Bedingungen detektiert werden konnte, muss in der Zukunft bewiesen werden, ob autophagozytotischer Zelltod auch in physiologischen Modellen vorhanden ist. Prinzipiell scheint die Zelle aber zwischen den zwei Wegen der Autophagozytose, dem Leben verlängernden und dem zerstörenden, unterscheiden zu können (zusammengefasst in Tsujimoto und Shimizu, 2005).

## I.3 Protein N-Glykosylierung

Protein N-Glykosylierung bezeichnet eine post-translationale Proteinmodifikation, bei der aktivierte Zuckerketten auf spezifische Regionen naszierender Proteine durch einen Multienzymkomplex übertragen werden. Dieser Prozess spielt eine essentielle Rolle während des Wachstums und der Differenzierung multizellulärer Organismen und ist unter anderem an der korrekten Faltung von Proteinen beteiligt. Die Wichtigkeit dieser Proteinmodifikation spiegelt sich in deren starker Konservierung von der Bäckerhefe bis zum Menschen wieder. Neben den Archaeen (Lechner und Wieland, 1989) konnte N-Glykosylierung auch in Bakterien nachgewiesen werden, wobei für letztere *Campylobacter jejuni* als best untersuchtes Beispiel genannt werden kann (Wacker *et al.*, 2002). Im Menschen konnte bis heute eine Reihe von genetisch bedingten Defekten in der N-Glykosylierungskaskade identifiziert werden, die zu schwerwiegenden Krankheitsbildern schon während der Embryonalentwicklung führen und als CDG-Syndrom („congenital disorders of glycosylation“) bezeichnet werden (zusammengefasst in Lehle *et al.*, 2006). Im Folgenden wird detaillierter auf die Struktur und Biosynthese der Glykoproteine und deren Übertragung auf das naszierende Protein eingegangen und eine Mutante des oben erwähnten Multienzymkomplexes ausführlicher dargestellt.

### I.3.1 Überblick über die eukaryotische N-Glykosylierung

Die Bildung des core-Oligosaccharids, genannt „lipid-linked oligosaccharide“ (LLO), beginnt auf der cytosolischen Seite mit dem Transfer zweier Acetyl-Glukosaminresten (UDP-GlcNAc) auf Dolicholphosphat, wobei Dolicholpyrophosphat-GlcNAc<sub>2</sub> (DolPP-GlcNAc<sub>2</sub>) gebildet wird (siehe Abb. I.4). Dolichol gehört zur Gruppe der Terpenoide und zeichnet sich durch 13-24 Isoprenuntereinheiten (in Hefe zwischen 14 und 18) und einer terminalen phosphorylierten Hydroxylgruppe aus. Anschließend werden wie in Abbildung I.4 gezeigt, fünf Mannosen auf DolPP-GlcNAc<sub>2</sub> übertragen, so dass DolPP-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>5</sub> gebildet wird, wobei GDP-Mannose als Zuckerdonor verwendet wird. Anschließend wird das Oligosaccharid von der cytoplasmatischen auf die luminal Seite der ER-Membran transloziert. Über diesen Translokationsprozess ist bis jetzt noch wenig bekannt. Es konnte lediglich eine Beteiligung des Membranproteins Rft1p nachgewiesen werden. Im ER-Lumen werden vier weitere Mannosen (von DolP-Man) und drei Glukosen (von DolP-Glc) an das Oligosaccharid angehängt. Dieses core-Oligosaccharid wird nun vom Schlüsselenzym der N-Glykosylierung, der Oligosaccharyltransferase (OST), auf die naszierenden Proteine übertragen. Die OST besteht aus neun Untereinheiten, fünf essentiellen (Stt3p, Ost1p, Wbp1p, Swp1p und Ost2p) und vier nicht essentiellen (Ost3p, Ost6p, Ost5p und Ost4p), die zusammen einen Multienzymkomplex bilden. Vieles spricht

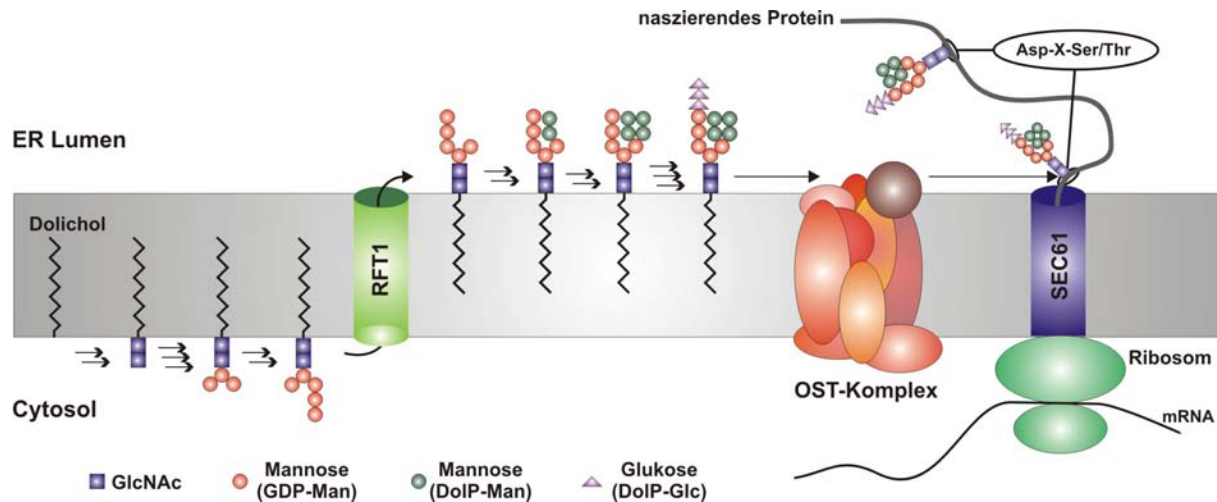
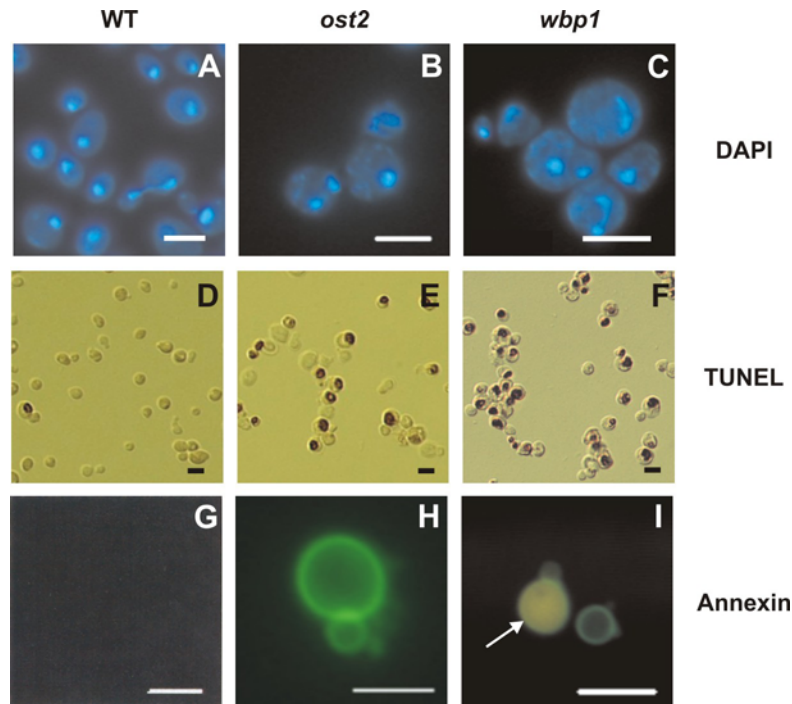


Abbildung 1.4: Illustration der im ER lokalisierten Schritte der N-Glykosylierung und des Transfers des core-Oligosaccharids auf das naszierende Protein durch den Oligosaccharyltransferasekomplex in *S. cerevisiae*.

dafür, dass *STT3* für die katalytische Domäne des Multienzymkomplexes kodiert. Die zu glykosylierenden Proteine werden von der OST anhand der Konsensussequenz Asparagin-X-Serin/Threonin erkannt, wobei X für jede beliebige Aminosäure außer Prolin stehen kann. Das Oligosaccharid  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$  wird dann vom Dolicholpyrophosphat auf den Amidstickstoff des Asparagins übertragen (zusammengefasst in Lehle *et al.*, 2006).

### **I.3.2 Defekte in der N-Glykosylierung führen zu apoptotischen Phänotypen in *S. cerevisiae***

Seit Anfang der 90er Jahre konnten mittels biochemischer und molekularbiologischer Methoden die neun oben genannten Untereinheiten als Bestandteile des OST-Komplexes identifiziert werden. Eine dieser Untereinheiten, Ost2p, zeigt 40% Identität zu Dad1p, einem in Eukaryoten hochkonservierten Protein, das ebenso wie Ost2p eine Untereinheit des OST-Komplexes darstellt. In der temperatursensitiven Zelllinie tsBN7, die aus einer „baby hamster kidney 21“ (BKH21) Zelllinie isoliert wurde, konnte eine Punktmutation in *DAD1* identifiziert werden, die für das Temperatur-induzierte apoptotische Absterben der Zellen verantwortlich war (Nakashima *et al.*, 1993; Niederer *et al.*, 2005). Für eine weitere OST-Untereinheit, Wbp1p, wurde zuerst eine Assoziation mit der Kernpore vorhergesagt. Später zeigte sich jedoch, dass *WBP1* für eine essentielle Untereinheit der OST kodiert. Zwei in diesem Gen defekte temperatursensitive Mutanten konnten isoliert werden, *wbp1-1* und *wbp1-2*, für die nach Umsetzen der Kulturen auf restriktive Temperatur eine Unterglykosylierung mehrerer analysierter Proteine, beispielsweise der Carboxypeptidase Y und der



**Abbildung I.5: Analyse apoptotischer Phänotypen induziert durch eine defekte N-Glykosylierung.**

Die Fragmentierung des Nukleus wurde durch Färbung der Zellen mit DAPI visualisiert (A-C). Einzelstrangbrüche der genomischen DNA wurden mittels des TUNEL-Tests nachgewiesen (D-F). Co-Färbung der Zellen mit Annexin V und PI identifiziert Phosphatidyltranslokation (G-I). Die Balken entsprechen 10µm (A-C, G-I) und 5µm (D-F). (Riel, 2000).

Proteinase A, nachgewiesen werden konnte (te Heesen *et al.*, 1992). Der Defekt in der *wbp1-1* Mutante ist durch zwei Nukleobasenaustausche, einmal von Cytosin nach Thymin (682. Nukleobase) und einmal von Guanin nach Adenin (683. Nukleobase), gekennzeichnet. Die Inkubation beider Mutanten, sowohl *ost2* als auch *wbp1-1*, führte nach Inkubation der Kulturen bei nicht permissiver Temperatur zu einer starken Unterglykosylierung von Proteinen und einem damit verbundenen Absterben der Zellen (Silberstein *et al.*, 1995; te Heesen *et al.*, 1992). Deswegen wurde untersucht, ob auch in der Bäckerhefe ein Defekt in der N-Glykosylierungsmaschinerie eine Induktion der Apoptose, so wie für Säugerzellen gezeigt, nach sich zieht. Hierfür wurden die Kulturen über Nacht bei 25 °C angezogen und anschließend bei einer restriktiven Temperatur von 37 °C inkubiert. Wie Abbildung I.5 zeigt, konnte eine Fragmentierung des Nukleus nach Inkubation der Zellen mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI), das mit der DNA interkaliert, sowohl in der *ost2* (Abb. I.5B) als auch in der *wbp1-1* (Abb. I.5C) Mutante, im Gegensatz zum korrespondierenden Wildtypstamm (Abb. I.5A) nachgewiesen werden. Auch zeigten beide Mutanten im Vergleich zum Wildtyp Einzelstrangbrüche auf, die mittels des TUNEL-Tests („*terminale desoxyribosyl-transferase mediated dUTP nick end labeling*“) visualisiert wurden (Abb. I.5D-F). Ein weiterer wichtiger apoptotischer Marker ist die Translokation von Phosphatidylserin von der inneren Schicht der Plasmamembran auf die äußere Schicht. Nach Verdau der Zellwand kann diese Translokation nach Inkubation der Zellen mit Annexin

V festgestellt werden, da der Farbstoff die Plasmamembran nicht durchdringen kann und so spezifisch nur an Phosphatidylserin in der äußeren Plasmamembran bindet. Um die Membranintegrität zu überprüfen, muss für diesen Test eine Gegenfärbung mit Propidiumjodid (PI) durchgeführt werden. Wie aus Abbildung I.5G-I zu ersehen ist, konnte im Gegensatz zum Wildtyp sowohl in *ost2* als auch in *wbp1-1* PS-Translokation nachgewiesen werden.

Diese Resultate deuten darauf hin, dass durch den Glykosylierungsdefekt in beiden Mutanten Apoptose ausgelöst wird.

## I.4 Zielsetzung

Wie unter I.3.2 angesprochen, zeigt eine Untereinheit der OST aus Hefe, Ost2p, 40% Homologie zum eukaryotischen Dad1p. In einer für dieses Gen temperatursensitiven Mutante konnten apoptotische Phänotypen während des Absterbens der Zellen bei restriktiver Temperatur nachgewiesen werden. Da Dad1p, ebenso wie sein Hefehomologes Ost2p, eine wichtige Rolle bei der N-Glykosylierung im Säuger spielt, könnte der Modellorganismus *S. cerevisiae* wegen der im Eukaryoten stark konservierten Proteinmodifikation weitere Einsichten auch in die apoptotische Signalkaskade im Zusammenhang mit defekter N-Glykosylierung bringen. Wie in der Diplomarbeit von C. Riel gezeigt wurde, konnten in den N-Glykosylierungsmutanten *wbp1-1* und *ost2* wichtige apoptotische Phänotypen, nämlich Fragmentierung des Nukleus, DNA-Strangbrüche und Phosphatidylserintranslokation nachgewiesen werden (Abb. I.5) (Riel, 2000). In der vorliegenden Arbeit sollten in *wbp1-1* aber auch im Wildtyp nach Hemmung der N-Glykosylierung durch Tunicamycin, weitere bekannte Apoptosekomponenten, wie Produktion reaktiver Sauerstoffspezies oder Caspase-ähnliche Aktivität untersucht werden. Da eine Beteiligung von der in der Hefe bislang einzigen bekannten Caspase Ycalp in dieser Signalkaskade im Rahmen der Untersuchungen ausgeschlossen werden konnte, wurde nach anderen potentiellen Proteasen in diesem Zusammenhang gesucht. Dabei wurde das Hauptinteresse auf Kex1p gelegt. Da für Kex1p tatsächlich gezeigt werden konnte, dass es in dieser Signalkaskade wirkt, wurde eine weitere Beteiligung von Kex1p am PCD ausgelöst durch chronologische Alterung oder Essigsäurestress untersucht.

Im Säuger wurden neben Apoptose weitere Formen des programmierten Zelltods beschrieben. Dazu zählen Apoptose-ähnlicher PCD, Nekrose-ähnlicher PCD und programmierte Autophagozytose (Leist und Jaattela, 2001, siehe auch oben). Auch in der Bäckerhefe zeichnet sich ab, dass Zellen unterschiedlich programmiert Absterben können. Da diese Formen des Zelltods jedoch teilweise gleiche oder ähnliche Phänotypen aufweisen, fällt es nicht immer leicht, zwischen den verschiedenen Formen zu unterscheiden. In dieser Arbeit sollte deshalb untersucht werden, ob in Zellen mit einem Defekt in der N-Glykosylierung neben apoptotischen Vorgängen auch Autophagozytose beteiligt ist.

Da über Komponenten des programmierten Zelltods in *S. cerevisiae* generell noch sehr wenig bekannt ist, sollten außerdem die Transkriptome apoptotischer und nicht apoptotischer Zellen miteinander verglichen werden, um Gene aufzuspüren, die in diese Signalkaskade involviert sind.

## **II. Ergebnisse und Diskussion**

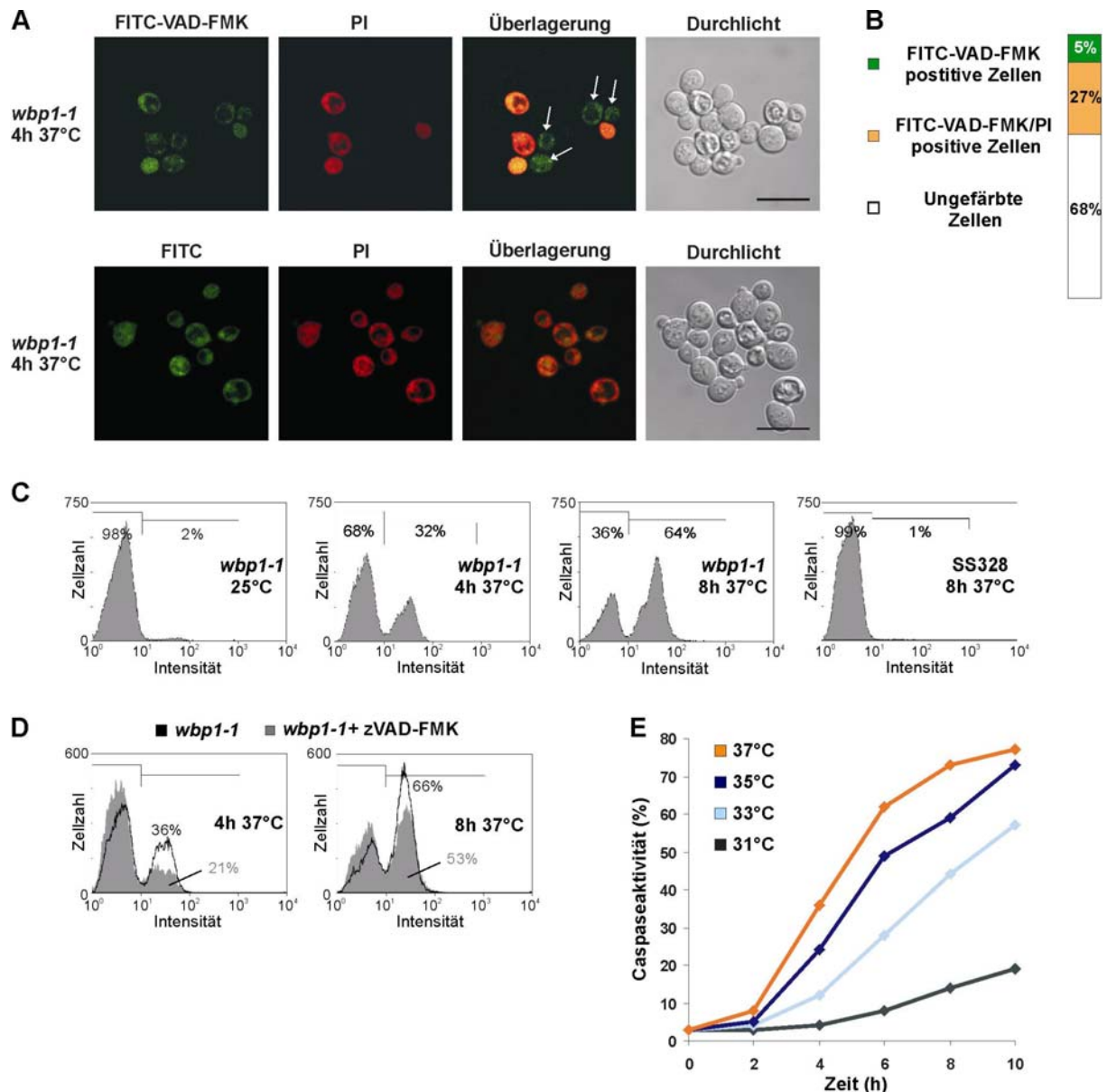
## II.1 Defekte in der N-Glykosylierung induzieren programmierten Zelltod in *S. cerevisiae*

### II.1.1 Defekte N-Glykosylierung in *wbp1-1* führt zu apoptotischen Phänotypen

#### II.1.1.1 Analyse von Caspaseaktivität *in vivo* und in zellfreien Extrakten

Die Aktivierung von Caspasen stellt in Säugerzellen eine wichtige Schlüsselrolle in der apoptotischen Signalkaskade dar. Wie in der Einleitung erwähnt (Kapitel I.1.5) konnte auch in *Saccharomyces cerevisiae* eine Caspase-ähnliche Aktivität nachgewiesen werden. Für diese Cysteinprotease, genannt „yeast caspase-1“ (*YCA1*), wurde eine proteolytische Aktivierung nach Überexpression nachgewiesen (Madeo *et al.*, 2002). Ebenso konnte durch Überexpression von *Yca1p* eine stark gesteigerte Spaltung von typischen Säugercaspasesubstraten gezeigt werden. Diese katalytische Aktivität wurde durch Zugabe eines Hemmstoffs, der gegen ein breites Spektrum von Säugercaspasen wirkt, inhibiert (Madeo *et al.*, 2002). In dieser Arbeit wurde der Einfachheit halber für die oben beschriebene Cysteinproteaseaktivität nicht nur der für die Bäckerhefe gängige Fachausdruck „Caspase-ähnliche Aktivität“ sondern auch „Caspaseaktivität“ verwendet. Nachdem in den temperatursensitiven N-Glykosylierungsmutanten *wbp1-1* und *ost2* nach einem „ts-Shift“ von 25 °C auf 37 °C apoptotische Phänotypen wie Chromatinkondensation, DNA-Fragmentierung und Translokation von Phosphatidylserin von der inneren Schicht der Plasmamembran auf die äußere nachgewiesen werden konnten (Diplomarbeit C. Riel), stellte sich die Frage, ob nach Induktion des programmierten Zelltods ebenso Caspaseaktivität auftrat. Hierfür wurden die Zellen mit dem FITC-konjugierten Derivat des Breitspektrum-Caspasehemmstoffs zVAD-FMK (Carbobenzoxy-Valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketon), der in Säugern irreversibel an das aktive Zentrum aktivierter Caspasen bindet, inkubiert (Ekert *et al.*, 1999). Da sowohl zVAD-FMK als auch sein Derivat FITC-VAD-FMK membrangängig sind, konnte Caspaseaktivität sowohl mittels konfokaler Mikroskopie (Abb. II.1A-B) als auch durch Durchflußzytometrie (Abb. II.1C-E) *in vivo* analysiert werden. Für die Untersuchungen am konfokalen Mikroskop wurden die Zellen neben FITC-VAD-FMK zusätzlich mit Propidiumjodid (PI) inkubiert. PI ist ein DNA-Interkalator, der nicht imstande ist, eine intakte Plasmamembran zu durchqueren. Somit wird er von lebenden Zellen ausgeschlossen. Wie in den Abbildungen II.1A (oben) und B dargestellt, führte das Umsetzen der N-Glykosylierungsmutante *wbp1-1* von 25 °C für 4 h auf 37 °C sowohl zu FITC-VAD-FMK (32%, grüner Kanal) als auch zu PI positiv gefärbten Zellen (27%, roter Kanal). Nach Überlagerung





**Abbildung II.1: Nachweis von Caspaseaktivität in *wbp1-1* durch Färbung der Zellen mit FITC-VAD-FMK (10µM).**

**A:** Co-Färbung von *wbp1-1* mit FITC-VAD-FMK (grüner Kanal, oben) oder FITC (0,1µM, grüner Kanal, unten) und PI (roter Kanal) und Analyse mittels konfokaler Mikroskopie nach einem „ts-Shift“ von 4 h auf 37 °C. Die Balken entsprechen 10 µm.

**B:** Quantitative Auswertung der gefärbten Zellen von (A). Pro Experiment wurden 300 Zellen analysiert.

**C:** Untersuchung der Caspaseaktivität in *wbp1-1* und Wildtyp mittels Durchflußzytometrie.

**D:** Hemmung der Caspaseaktivität durch Zugabe des Breitspektrum-Caspasehemmstoffs zVAD-FMK (20 µM). zVAD-FMK wurde wie unter V.2.2 beschrieben zugegeben.

**E:** Temperatur- und zeitabhängige Zunahme der Caspaseaktivität. Die Zellanalyse erfolgte mittels Durchflußzytometrie. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

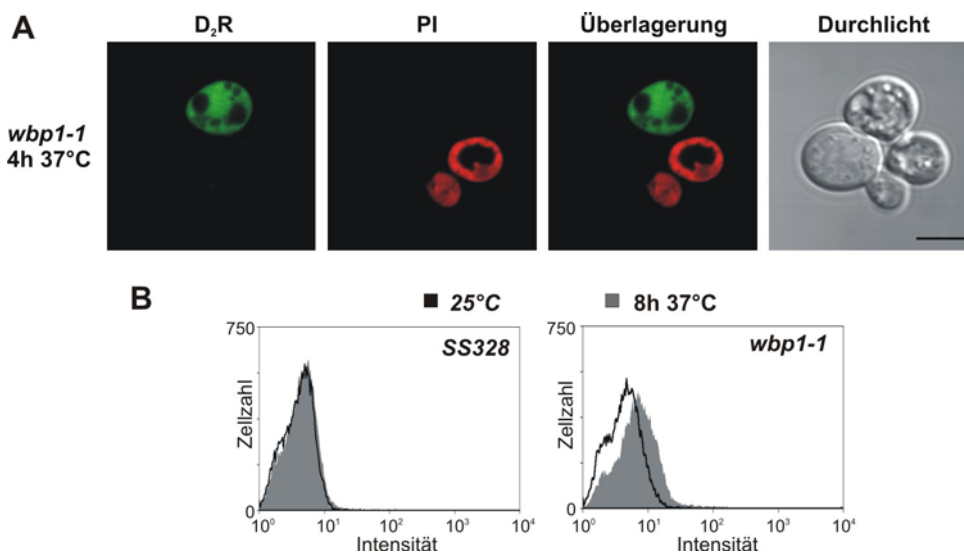
beider Kanäle wurde deutlich, dass viele Zellen Co-Färbung aufzeigten, 5% jedoch nur mit dem FITC modifizierten Caspasehemmstoff gefärbt waren (Abb. II.1A oben, 3. Bild von links, weiße Pfeile, II.1B). Seit kurzem gibt es Hinweise, dass FITC-VAD-FMK für die Detektion von Caspaseaktivität in *S. cerevisiae* ein problematisches Substrat darstellt (Vachova und Palkova, 2005). Aufgrund dessen wurden als Kontrolle Zellen der *wbp1-1* Mutante nach Kultivierung für 4 h bei 37 °C mit dem

Chromophor FITC und PI inkubiert und mittels konfokaler Mikroskopie analysiert (Abb. II.1A, unten). Es zeigte sich, dass alle Zellen die positiv für PI waren (ca. 27% der Gesamtpopulation) auch eine positive Färbung für FITC aufwiesen. Dies bedeutet, dass FITC und daher möglicherweise auch FITC-VAD-FMK unspezifisch an zelluläre Bestandteile toter Zellen binden können. In diesem Experiment konnten jedoch keine Zellen detektiert werden, die nur mit FITC aber nicht mit PI gefärbt waren. Da jedoch nach Färbung mit FITC-VAD-FMK und PI, wie oben beschrieben, Zellen identifiziert wurden, die nur eine positive Färbung für den FITC-konjugierten Caspasehemmstoff aufwiesen, kann davon ausgegangen werden, dass in diesen Zellen der fluoreszierende Hemmstoff nicht unspezifisch, sondern tatsächlich an das aktive Zentrum von Caspasen bindet. Auch die Ergebnisse der Durchflußzytometrie stützen diesen Befund. Nach Inkubation von *wbp1-1* für 4 h, 6 h oder 8 h bei restriktiver Temperatur war der Anteil FITC-VAD-FMK-gefärbter Zellen immer ca. 5% größer als der Anteil an Zellen, die auch durch das Chromophor FITC gefärbt wurden. Somit werden in *wbp1-1* mit FITC-VAD-FMK nicht nur Caspase-positive Zellen sondern auch Zellen mit zerstörter Membranintegrität detektiert. Aufgrund der limitierten Möglichkeiten den zeitlichen Verlauf des PCD in *wbp1-1* zu verfolgen, wurde der FITC-konjugierte Inhibitor dennoch als Marker des programmierten Zelltods verwendet, wobei mit dieser Sonde aber nicht nur apoptotische, sondern auch post-apoptotische Zellen detektiert werden. In dieser Arbeit werden FITC-VAD-FMK-positive Zellen auch Caspase-positive Zellen genannt, obwohl diese Bezeichnung nicht für alle detektierten Zellen zutrifft.

Da die quantitative Auswertung mikroskopischer Bilder (Abb. II.1B) einen zeitintensiven Prozess darstellt, wurden FITC-VAD-FMK gefärbte Zellen auch mittels durchflußzytometrischer Analysen untersucht (Abb. II.1C-E). Die Induktion des Glykosylierungsdefekts in der *wbp1-1* Mutante durch einen „ts-Shift“ von 25 °C auf die restriktive Temperatur führte zur Aktivierung von Caspasen (32% und 64% nach 4 und 8 h bei 37 °C). Die bei permissiver Temperatur inkubierte Kontrolle wies nur eine marginale Anzahl an FITC-positiven Zellen auf (2%). Auch im isogenen Wildtypstamm SS328 konnte nach 8-stündiger Inkubation bei 37 °C keine Caspaseaktivität detektiert werden (Abb. II.1C). In einem weiteren Experiment wurde die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Inkubationszeit und der Inkubationstemperatur untersucht. Hierfür wurden Kulturen der *wbp1-1* Mutante bei 25 °C angezogen, für 2 bis 10 h bei 31 °C, 33 °C, 35 °C und 37 °C inkubiert und anschließend mit FITC-VAD-FMK gefärbt. Aus Abbildung II.1E geht hervor, dass die Anzahl der FITC-VAD-FMK-positiven Zellen mit steigender Temperatur und Inkubationszeit zunahm. Um eine mögliche hemmende Wirkung des Breitspektrum-Caspasehemmstoffs zVAD-FMK zu überprüfen, wurde der Hemmstoff zweimal in einer Konzentration von je 10 µM zur Kultur gegeben, einmal zu Beginn des Temperaturshifts und einmal 30 min vor dem Ernten der Zellen. Die Zugabe des Hemmstoffs erfolgte zu zwei unterschiedlichen Zeiten, da über dessen Stabilität nichts bekannt war. Außerdem sollte dadurch die Bindung des Hemmstoffs an das aktive Zentrum aktivierter Caspasen vor der Färbung mit FITC-VAD-FMK ermöglicht werden. Die Vorinkubation der Zellen mit zVAD-FMK hatte eine

Reduktion der Enzymaktivität sowohl nach 4 h von 36% auf 21% als auch nach 8 h von 66% auf 53% zur Folge (Abb. II.1D).

Da wie oben erwähnt vor kurzem festgestellt wurde, dass der FITC konjugierte Caspasehemmstoff zVAD-FMK unter bestimmten Bedingungen unspezifisch binden kann, wurde ein weiteres Caspasesubstrat, das sich ebenso für die Analyse von Caspaseaktivität in *S. cerevisiae* eignet, verwendet (Vachova und Palkova, 2005; Wysocki und Kron, 2004). Dieses Substrat, (Asp)<sub>2</sub>-Rhodamine 110 (D<sub>2</sub>R), besteht aus einem Rhodamin 110-Molekül, an das zwei Aspartatreste gekoppelt sind und ebenso wie FITC-VAD-FMK sehr gut membrangängig ist. Im Gegensatz zu FITC-VAD-FMK, das durch irreversible Bindung des fluoreszierenden Hemmstoffs an das aktive Zentrum aktivierter Caspasen bindet, muss das nichtfluoreszierende Substrat D<sub>2</sub>R aktiv gespalten werden. Nach Umsetzung des Substrats in monosubstituiertes oder freies Rhodamin durch Caspasen oder Aspartasen (das sind Proteasen, die Substrate nach einem Aspartatrest spalten) steigt die Fluoreszenzintensität um das 1.000fache bzw. 10.000fache an (Hug *et al.*, 1999). Nach einem „ts-Shift“ von 4 h auf 37 °C konnten in der *wbp1-1* Mutante sowohl Rhodamin 110 (grüner Kanal) als auch PI (roter Kanal) positive Zellen detektiert werden. Bei den mikroskopischen Analysen konnte jedoch keine einzige Zelle identifiziert werden, die eine positive Färbung für beide Farbstoffe aufzeigte (Abb. II.2A). Zur



**Abbildung II.2: Analyse von Caspase- bzw. Aspartaseaktivität in *wbp1-1* durch Inkubation der Zellen mit D<sub>2</sub>R.**

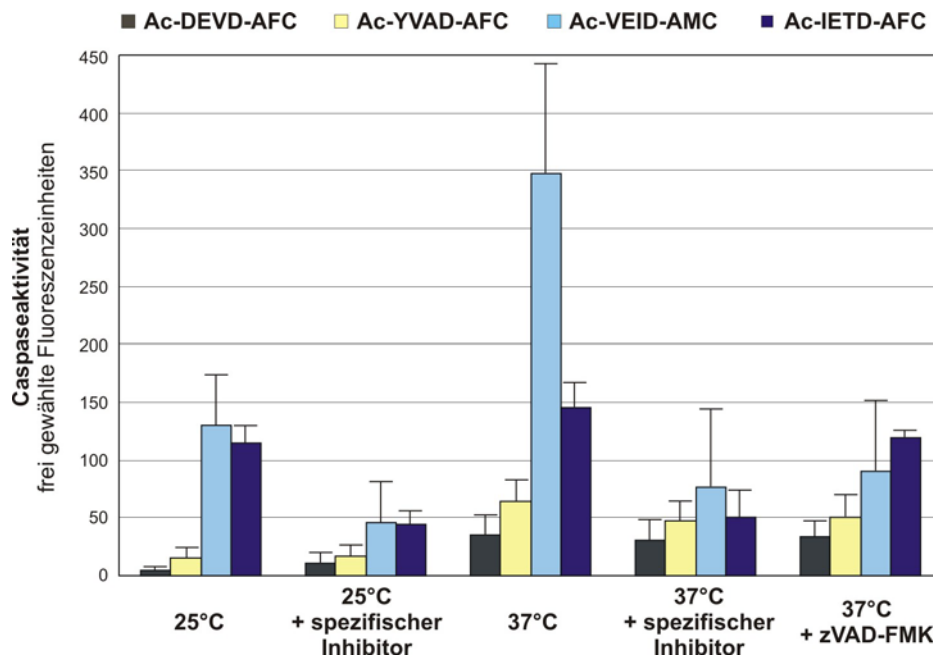
A: Analyse der Co-Färbung von *wbp1-1* mit D<sub>2</sub>R (grüner Kanal) und PI (roter Kanal) nach einem „ts-Shift“ von 4 h auf 37 °C mittels konfokaler Mikroskopie. Der Balken entspricht 5 µm.

B: Quantitative Auswertung der Caspaseaktivität nach D<sub>2</sub>R-Inkubation der Wildtypzellen SS328 und Zellen der *wbp1-1* Mutante nach Inkubation bei 25 °C (schwarz) bzw. 8 h bei 37 °C (grau).

Quantifizierung der Zellen mit Caspaseaktivität wurden Kulturen des Wildtypstamms SS328 und der *wbp1-1* Mutante für 4, 6 und 8 h bei 37 °C kultiviert, die Zellen mit D<sub>2</sub>R inkubiert und anschließend mittels Durchflußzytometrie analysiert. Im Gegensatz zu Wildtypzellen, die auch nach 8 h Inkubation bei 37 °C nicht imstande waren das Caspasesubstrat zu spalten, zeigten 5 bis 8% der Mutantenzellen

Caspaseaktivität, unabhängig von der Inkubationszeit, was durch eine Verlagerung der Population in den Bereich höherer Fluoreszenzintensität sichtbar wurde (Abb. II.2B, rechts). Dies bedeutet, dass das Caspasesubstrat D<sub>2</sub>R nur von Zellen gespalten wird, die ihre Membranintegrität noch nicht verloren haben. Dieses Resultat war übereinstimmend mit dem Ergebnis der konfokalen Mikroskopie, bei der keine co-gefärbten Zellen detektiert wurden. Da die Zellen nach Induktion von Apoptose, wie schon für die Färbung mit FITC-VAD-FMK gezeigt, bald in einen post-apoptotischen, Nekrose ähnlichen Zustand übergehen (positive PI-Färbung), konnte für das Substrat D<sub>2</sub>R auch keine Zunahme der gefärbten Zellen festgestellt werden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass nur diejenigen Zellen mit intakter Cytoplasmamembran über aktive Caspasen/Aspartasen verfügten, die noch in der Lage waren D<sub>2</sub>R zu spalten. Im Falle von FITC-VAD-FMK scheint es sich so zu verhalten, dass der Caspasehemmstoff spezifisch an das aktive Zentrum von Caspasen intakter Zellen aber auch unspezifisch an zelluläre Bestandteile toter Zellen binden kann. Für beide Caspasesubstrate, FITC-VAD-FMK sowie D<sub>2</sub>R, wurde etwa die gleiche Anzahl an Zellen mit Caspaseaktivität detektiert (ca. 5%, II.1B und II.2B), die keine PI-Färbung aufwiesen. Dies lässt auf eine eindeutige Beteiligung von Caspasen bzw. Aspartasen am programmierten Zelltod schließen.

Nachdem Caspaseaktivität *in vivo* mittels zweier Caspasesubstrate nachgewiesen werden konnte, sollte in dem folgenden Experiment Caspaseaktivität *in vitro* mittels eines fluorimetrischen Tests analysiert werden. Hierbei wurde getestet, inwieweit zellfreie Extrakte des Wildtyps und der *wbp1-1* Mutante in der Lage sind, verschiedene aus Säugern bekannte Caspasesubstrate zu spalten. In Vorversuchen mit Extrakten aus *wbp1-1* inkubiert für 4 h bei 37 °C konnte nachgewiesen werden, dass der Umsatz aller vier verwendeter Caspasesubstrate einen linearen Verlauf für bis zu 13 h Inkubationszeit zeigte (für Ac-VEID-AMC konnte ein linearer Substratumsatz auch nach 24 h gemessen werden) (Ergebnisse nicht gezeigt). Des Weiteren konnte eine Abhängigkeit des Substratumsatzes (Ac-IETD-AFC) von der vorhandenen Substratkonzentration und der Proteinkonzentration nachgewiesen werden (Ergebnis nicht gezeigt). Für das eigentliche Experiment wurden die Kulturen bei 25 °C oder für 6 h bei 37 °C inkubiert, Zellextrakte isoliert, die Caspasesubstrate *N*-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-Amino-4-Trifluoromethylcoumarin (Ac-DEVD-AFC), *N*-Acetyl-Tyr-Val-Ala-Asp-7-Amino-4-Trifluoromethylcoumarin (Ac-YVAD-AFC), *N*-Acetyl-Val-Glu-Ile-Asp-7-Amino-4-Methylcoumarin (Ac-VEID-AMC) oder *N*-Acetyl-Ile-Glu-Tyr-Asp-7-Amino-4-Trifluoromethylcoumarin (Ac-IETD-AFC) zugegeben und die Fluoreszenz des Reaktionsansatzes im Fluorimeter verfolgt. Während Ac-DEVD-AFC und Ac-YVAD-AFC schlechte Substrate darstellten und nur eine geringe Zunahme der Fluoreszenzintensität nach dem „ts-Shift“ im Vergleich zum Nullwert (Abb. II.3, Werte bei 25 °C) detektiert wurde, konnten Ac-VEID-AMC und abgeschwächt Ac-IETD-AFC durch den aus *wbp1-1* nach 6 h Inkubation bei 37 °C gewonnenen Enzymextrakt sehr gut umgesetzt werden (Abb. II.3, mittlerer Balkenblock). Die Spaltung der beiden Substrate konnte sowohl durch spezifische Aldehydhinhibitoren (z.B. Ac-VEID-CHO, Abb. II.3, 2. und 4. Balkenblock von links) als auch durch den unspezifischen Pancaspaseinhibitor zVAD-FMK signifikant reduziert



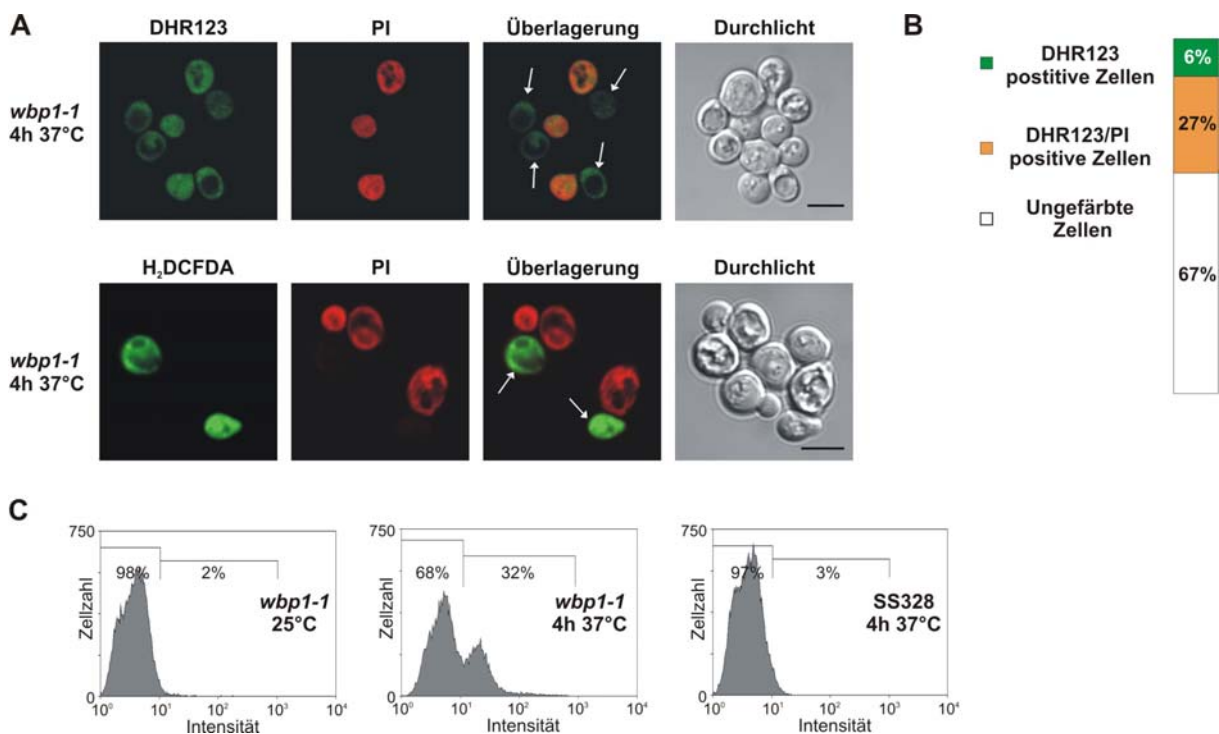
**Abbildung II.3: Caspaseaktivität in zellfreien Extrakten.**

Die zellfreien Extrakte wurden aus der *wbp1-1* Mutante nach einem „Temperaturshift“ von 6 h auf 37 °C gewonnen. Anschließend wurde die proteolytische Fähigkeit des Zellextrakts bezüglich der Spaltung von Ac-DEVD-AFC, Ac-YVAD-AFC, Ac-VEID-AMC und Ac-IETD-AFC untersucht. Im 2. und 4. Balkenblock von links wurden dem Reaktionsmix für das jeweilige Substrat spezifische Aldehydinhibitoren zugesetzt, im rechten Balkenblock der Breitbank Caspasehemmstoff zVAD-FMK.

werden. Im Gegensatz dazu wurde Ac-VEID-AMC durch einen Enzymextrakten aus Wildtypzellen nach Inkubation für 6 h bei 37 °C nicht umgesetzt (Ergebnis nicht gezeigt). Abbildung II.3 (1. und 2. Balkenblock von links) zeigt, dass in der *wbp1-1* Mutante auch bei 25 °C eine geringe Caspaseaktivität messbar war, die durch die entsprechenden spezifischen Caspaseinhibitoren gehemmt werden konnten. Dies ist vermutlich auf den geringen N-Glykosylierungsdefekt von *wbp1-1*, der bereits bei 25 °C auftritt, zurückzuführen (siehe Abb. II.10B). Nach Analyse der Neusynthese der Carboxypeptidase Y, einem Modellprotein für die Untersuchung von N-Glykosylierungsdefekten in *S. cerevisiae*, wurden neben der maturen Form zwei unterglykosylierte Formen der CPY detektiert, obwohl die *wbp1-1* Mutante bei permissiver Temperatur (25 °C) inkubiert worden war (Abb. II.10B, 2. Spur von links) (te Heesen *et al.*, 1992). In Säugerzellen wurde nachgewiesen, dass Induktion von ER-Stress mittels Thapsigargin und Brefeldin-A Induktion von Apoptose zur Folge hatte, wobei die beiden Initiatorcaspasen-9 und -12 sowie die Effektorcaspase-3 benötigt werden (Rao *et al.*, 2004). Ebenso wurde Induktion des programmierten Zelltods nach Zerstörung des Calciumhaushalts im ER durch Calpain-abhängige Aktivierung der Caspase-12 beobachtet (Nakagawa und Yuan, 2000). Da auch in *S. cerevisiae* durch Defekte in der N-Glykosylierung ER-Stress ausgelöst wird, könnte dies zur Aktivierung von Aspartasen, die Ähnlichkeit zu Säugercaspasen aufweisen, führen. Dies würde nicht nur die basale Caspaseaktivität in *wbp1-1* bei einer Inkubationstemperatur von 25 °C erklären, sondern auch die Zunahme der katalytischen Aktivität nach Erhöhung von ER-Stress durch Inkubation bei 37 °C.

### II.1.1.2 Nachweis von Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Sauerstoffradikale spielen eine wichtige Rolle bei der Induktion der apoptotischen Signalkaskade in Metazoen. In *S. cerevisiae* konnte eine Ansammlung von „reactive oxygen species“ (ROS) erstmals in einer *cdc48* Mutante und durch Überexpression des humanen pro-apoptotischen Faktors Bax nachgewiesen werden (Madeo *et al.*, 1999). Seither wurde in der Bäckerhefe für mehrere Apoptose-auslösende Agenzien und Mutationen ROS-Produktion nachgewiesen. Als Nachweisreagenz wurden in dieser Arbeit neben 2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat ( $H_2DCFDA$ ) vor allem Dihydro-rhodamin 123 (DHR123) verwendet, das durch reaktive Sauerstoffspezies in das fluoreszierende Chromophor Rhodamin 123 oxidiert wird. Mittels konfokaler Mikroskopie konnte nach 4 h Inkubation bei 37 °C und Co-Färbung der *wbp1-1* Mutante mit DHR123 (grüner Kanal) und PI (roter Kanal) gezeigt werden, dass 33% der Zellen positive DHR123-Färbung aufwiesen. 6% davon waren nicht mit PI co-gefärbt, sondern zeigten ausschließlich Rhodamin 123 Färbung (Abb. II.4A (oben) und B). Nahezu die gleiche Anzahl an Rhodamin 123-gefärbten Zellen konnte in einer durchflußzytometrischen Analyse detektiert werden (32%, Abb. II.4C). Dagegen zeigten in der bei 25 °C inkubierten Mutante und im Wildtypstamm SS328 nach 4stündiger Inkubation bei 37 °C nur vereinzelte Zellen ROS-Akkumulation (Abb. II.4C). Wie im Falle der FITC-VAD-FMK-Färbung



**Abbildung II.4: Defekte in der N-Glykosylierung führen zu ROS-Akkumulation.**

A: Co-Färbung der *wbp1-1* Mutante mit DHR123 (grüner Kanal, oben) oder  $H_2DCFDA$  (grüner Kanal, unten) und PI (roter Kanal). Die Analyse erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie nach einem „ts-Shift“ von 4 h auf 37 °C. Weiße Pfeile zeigen Zellen, die ausschließlich ROS-Akkumulation aufwiesen. Die Balken entsprechen 5  $\mu m$ .

B: Quantitative Auswertung der gefärbten Zellen von (A). Pro Experiment wurden 300 Zellen analysiert.

C: Durchflußzytometrische Analyse von DHR123-positiven Zellen (Wildtyp und *wbp1-1*) nach Inkubation bei 25 °C und 4 h bei 37 °C.



(Abb. II.1E), war die Färbung mit DHR123 stark abhängig sowohl von der Inkubationszeit als auch von der Inkubationstemperatur (Ergebnisse nicht gezeigt). Ebenfalls wurde eine hohe Anzahl an Zellen detektiert, die sowohl mit DHR123 als auch mit PI gefärbt waren. Ca. 6% der analysierten Zellen zeigten dagegen ausschließlich positive Rhodamin 123-Färbung (Abb. II.4A und B). Dies stützt die in Abschnitt II.1.1.1 aufgestellte These, dass nach Induktion des programmierten Zelltods die Zellen relativ schnell in einen post-apoptotischen, nekrotischen Zustand übergehen. Da mit DHR123 also nicht nur ROS produzierende apoptotische, sondern auch post-apoptotische Zellen detektiert werden, wurde ein weiteres Reagens verwendet, um ROS-Akkumulation zu visualisieren, nämlich H<sub>2</sub>DCFDA. Wie aus Abbildung II.4A (unten) hervorgeht, werden mit diesem Reagens ausschließlich apoptotische Zellen gefärbt, die ROS akkumulieren, da keine Co-Färbung mit PI auftritt. Da wie oben angesprochen, die Zellen nach Induktion des programmierten Zelltods schnell in einen post-apoptotischen Zustand übergehen, wurde keine weitere Zunahme an ROS-positiven Zellen mit diesem

Gen	Funktion des Genprodukts	wbp1-1 37 °C → WT 37 °C	Veränderung	wbp1-1 37 °C → wbp1-1 25 °C	Veränderung
<i>AAD4</i>	Mögliche Aryl-Alkoholdehydrogenase mit Ähnlichkeit zur Aryl-Alkoholdehydrogenase aus <i>P. chrysosporium</i> ; ist an der Beseitigung von oxidativem Stress beteiligt	2	I	2,1	I
<i>AAD6</i>	Mögliche Aryl-Alkoholdehydrogenase mit Ähnlichkeit zur Aryl-Alkoholdehydrogenase aus <i>P. chrysosporium</i> ; ist an der Beseitigung von oxidativem Stress beteiligt	2,8	I	2,1	I
<i>CTT1</i>	Cytosolische Katalase T; schützt die Zelle gegen oxidative Schädigung durch Wasserstoffperoxid	4	I	2,3	I
<i>GAD1</i>	Glutamatdecarboxylase, wandelt Glutamat in Gammaaminobuttersäure (GABA) während des Glutamatstoffwechsels um; ist an der Beseitigung von oxidativem Stress beteiligt	3,5	I	3,5	I
<i>RCK1</i>	Proteinkinase; ist an der Beseitigung von oxidativem Stress beteiligt	2	I	7	I
<i>TRR2</i>	Thioredoxinreduktase	2	I	1,6	I
<i>UGA1</i>	Gammaaminobuttersäure (GABA) Transaminase; beteiligt an der Degradation von 4-Aminobutyrat und Glutamat; notwendig für normale Toleranz gegenüber oxidativem Stress	2,3	I	2	I

**Tabelle II.1: Zusammenfassung der hochregulierten Gene, die an der Beseitigung von ROS beteiligt sind.**

Eine Zunahme der mRNA-Konzentration mindestens um das 2fache wurde als Signifikant erachtet. Für die Veränderung der Transkriptomte zueinander wurde folgende Abkürzung verwendet: Increase (I).

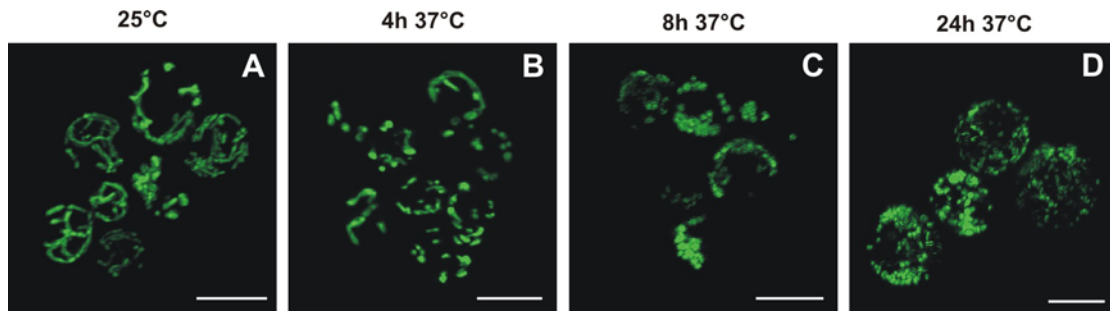
Reagenz festgestellt. Sowohl nach 4 h und 6 h, als auch nach 8 h bei restriktiver Temperatur waren zwischen 5 und 10% der *wbp1-1* Zellen mit H<sub>2</sub>DCFDA gefärbt. Um den Verlauf des PCD untersuchen zu können, wurde nachfolgend DHR123 zur Detektion von ROS verwendet, wobei nicht nur apoptotischen, sondern auch post-apoptotische Zellen gefärbt wurden.

Ein weiterer Hinweis auf vermehrte Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies wurde nach Auswertung der Transkriptomanalyse (siehe im Detail V.4.9.1) erhalten. Beim Vergleich der *wbp1-1* Mutante mit dem korrespondierenden Wildtypstamm, beide inkubiert für 4 h bei 37 °C und der *wbp1-1* Mutante, inkubiert bei 25 °C und 37 °C, konnte in *wbp1-1* eine Hochregulation von sieben Genen nachgewiesen werden, die bei der Reduktion von oxidativem Stress eine Rolle spielen. Neben *ADD4*, *ADD6*, *GAD1*, *RCK1*, *TRR2* und *UGA1*, die auf verschiedene Arten dem oxidativen Stress entgegenwirken, befand sich unter den hochregulierten Genen die cytosolische Katalase T (*CTT1*), die direkt an der Entgiftung von Peroxiden beteiligt ist (Tabelle II.1). Ob diese auch im Cytosol identifizierten reaktiven Sauerstoffspezies (Abb. II.4A) in den Mitochondrien oder im ER gebildet wurden, konnte anhand dieser Versuche nicht ermittelt werden.

### II.1.1.3 Analyse der Mitochondrienmorphologie mittels konfokaler Mikroskopie

Vor kurzem konnte eine Fragmentierung des mitochondriellen Netzwerks in Säugerzellen nach Induktion von Apoptose nachgewiesen werden. Dieser Prozess könnte möglicherweise bei der Freisetzung von Cytochrom *c*, das im Säuger für die Bildung des Apoptosom-Komplexes benötigt wird, vom mitochondriellen Intermembranbereich ins Cytosol beteiligt sein (Karbowski und Youle, 2003). Des Weiteren konnte in *C. elegans* eine Beteiligung der Mitochondrien am PCD identifiziert werden. Induktion von Apoptose mittels des pro-apoptotischen „BH3-only“ Proteins EGL-1 („egg-laying defective“) verursacht Mitochondrienfragmentierung, was eine wichtige Rolle der Mitochondrien im Signalweg des programmierten Zelltods in *C. elegans* impliziert (Jagasia *et al.*, 2005). Die mitochondrielle Beteiligung an Apoptosevorgängen konnte nicht nur in *C. elegans* und Säugerzellen beobachtet werden, sondern auch in der Bäckerhefe. Hier wiesen Zellen, in denen Apoptose mittels Wasserstoffperoxid oder Essigsäurestress induziert worden war, mitochondrielle Fragmentierung auf (Fannjiang *et al.*, 2004). Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, wie sich Induktion der apoptotischen Signalkaskade durch defekte N-Glykosylierung auf die Mitochondrienmorphologie auswirkt. Hierfür wurde *wbp1-1* mit dem Überexpressionsvektor pVT100 transformiert, in den zur Visualisierung der Mitochondrien eine mitochondrielle Matrix-Transportsequenz fusioniert mit GFP kloniert worden war (Westermann und Neupert, 2000). Um eine Vorstellung des intakten mitochondriellen Netzwerks zu bekommen wurde *wbp1-1* pVT100-mt-GFP über Nacht bei 25 °C auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 angezogen. Die Mitochondrien dieser Kultur wiesen ein deutlich sichtbares tubuläres mitochondrielles Netzwerk auf (Abb. II.5A), das sich auch nach weiterer Inkubation für 24 h bei 25 °C nicht veränderte (Ergebnis nicht gezeigt). Die ungleichmäßige Visualisierung der





**Abbildung II.5: Induktion des N-Glykosylierungsdefekts induziert Mitochondrienfragmentierung.**

*wbp1-1 pVT100-mt-GFP* wurde in Minimalmedium ohne Uracil über Nacht bei 25 °C auf eine  $OD_{600}$  von 0,2 angezogen. Die Zellen wurden gewaschen und mittels konfokaler Mikroskopie analysiert (A). Die restliche Kultur wurde für 4 h (B), 8 h (C) und 24 h (D) auf 37 °C umgesetzt und wie für die Kontrolle beschrieben behandelt. Die Balken entsprechen 10  $\mu$ m.

Mitochondrien in den einzelnen Zellen ist auf die unterschiedliche Expression der Plasmide bzw. auf verschiedene Kopienzahlen der Plasmide pro Zelle zurückzuführen. Induktion des programmierten Zelltods durch Umsetzen der Mutante auf restriktive Temperatur führte zu einer zunehmenden Fragmentierung der Mitochondrien. Nach 4 h bei 37 °C konnten noch einige tubuläre Strukturen identifiziert werden (Abb. II.5B), wobei dieses Netzwerk anhand seiner Komplexität bei weitem nicht mehr mit der Kontrolle (Abb. II.5A) verglichen werden kann. Mit der Zeit nahm die Fragmentierung der Mitochondrien immer weiter zu, bis nur noch kleine mitochondrielle Bruchstücke identifiziert werden konnten (Abb. II.5C und D). Dies zeigt, dass Mitochondrien in dieser apoptotischen Signalkaskade eine wichtige Rolle einnehmen, da dadurch pro-apoptotisch wirkende Substanzen, wie Cytochrom *c* oder Aif1p, vom mitochondriellen Intermembranbereich ins Cytosol gelangen.

Ein weiterer Hinweis auf Veränderungen der Mitochondrienmorphologie wurde mittels einer Transkriptomanalyse erbracht. Nach einem „ts-Shift“ von 4 h auf die restriktive Temperatur sind in *wbp1-1* vor allem im Vergleich zum Wildtypstamm Gene hochreguliert, die für die Erhaltung der Mitochondrienmorphologie wichtig sind. Nullmutanten zweier dieser Gene, *MAMI* und *GEM1*, weisen keine tubulären sondern vielmehr globuläre Mitochondrienstrukturen auf, was darauf hindeutet, dass diese Gene eine wichtige Funktion für die Instandhaltung der Mitochondrien einnehmen (Entian *et al.*, 1999; Frederick *et al.*, 2004) (Tabelle II.2). Ein weiteres Gen, das für die mitochondrielle Cardiolipinsynthese kodiert, *CRD1*, wird für die Erhaltung eines normalen mitochondriellen Membranpotentials und für die Funktion der Mitochondrien benötigt (Jiang *et al.*, 2000). Durch eine vermehrte Bildung des einzigen mitochondriellen Phospholipids Cardiolipin versucht die Zelle möglicherweise die Membranen zu stabilisieren oder die Mitochondrien zu vergrößern, um die angestiegene Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies oder ungefalteten mitochondriellen Proteinen auszudünnen.

Gen	Funktion des Genprodukts	wbp1-1 37 °C → WT 37 °C	Veränderung	wbp1-1 37 °C → wbp1-1 25 °C	Veränderung
<i>CRD1</i>	Cardiolipinsynthase; bildet Cardiolipin, das eine wichtige Komponente der Mitochondrienmembran darstellt; notwendig für normales Potential und Funktion der Mitochondrienmembran	2,1	I	1,1	NC
<i>MAM3</i>	Protein notwendig für normale Mitochondrienmorphologie	2	I	2,1	I
<i>GEM1</i>	Während der Evolution stark konservierte in der äußeren Mitochondrienmembran verankerte GTPase, die die Mitochondrienmorphologie reguliert; <i>GEM1</i> Nullmutanten besitzen zusammengefallene, runde oder traubenförmige Mitochondrien	2,6	I	1,2	NC

**Tabelle II.2: Zusammenfassung der hochregulierten Genen, die für die Erhaltung der Mitochondrienmorphologie wichtig sind.**

Für die Veränderung der Transkriptome zueinander wurden folgende Abkürzungen verwendet: Increase (I), not countabel (NC).

#### II.1.1.4 Fragmentierung der DNA durch defekte N-Glykosylierung

Das Auftreten von DNA-Bruchstücken, die auch als DNA-Leiter bezeichnet werden, ist ein typisches Indiz für Apoptose. Diese etwa 200 Basenpaar großen DNA-Fragmente wurde erstmals mittels Agarose-Gelelektrophorese in Säugerzellen nach Behandlung mit Glukokortikoiden nachgewiesen (Wyllie, 1980). Eine weitere Methode zur Identifizierung von DNA-Fragmentierung *in situ* ist der so genannte TUNEL („terminal transferase dUTP nick end labeling“) Test (Gavrieli *et al.*, 1992). Mit diesem Test konnte DNA-Fragmentierung nach Induktion von Apoptose nicht nur in Säugern, sondern auch in *Saccharomyces cerevisiae* nach Behandlung der Zellen mit Stressoren und in Mutanten nachgewiesen werden (Ribeiro *et al.*, 2006). Auch die beiden N-Glykosylierungsmutanten *wbp1-1* und *ost2* zeigten nach Induktion von PCD ein positives Ergebnis im TUNEL-Test (siehe Abb. I.5D-F). Vor kurzem konnte außerdem erstmals in Hefe nach Induktion von Apoptose mittels Wasserstoffperoxid- und Essigsäurestress eine Fragmentierung der DNA zu einer DNA-Leiter, ähnlich der in Säugern, identifiziert werden. Hierfür wurde nicht die standardmäßige Agarose-Gelelektrophorese verwendet, sondern die „Pulsed-Field-Gelelektrophorese“, da hiermit eine bessere Auftrennung von großen DNA-Fragmenten erzielt werden konnte (Ribeiro *et al.*, 2006). Um DNA-Fragmentierung mittels Agarose-Gelelektrophorese in *wbp1-1* zu untersuchen, wurde eine Kultur dieser Mutante über Nacht bei 25 °C angezogen, anschließend für 12 h, 16 h und 22 h bei 37 °C inkubiert und die genomische DNA isoliert. Hiervon wurden je 4,5 µg auf ein 1,6%iges Agarosegel

geladen und für 3,5 h aufgetrennt, wobei jedoch keine Zerstückelung des Genoms trotz Umsetzen der Kultur auf die restriktive Temperatur im Vergleich zur 25 °C Kontrolle identifiziert werden konnte (Ergebnis nicht gezeigt). Aufgrund der oben genannten neuen Erkenntnisse könnte das negative Ergebnis durch die Anwendung der Agarose-Gelelektrophorese anstelle der „Pulsed-Field-Gelelektrophorese“ zustande gekommen sein, was zu beweisen wäre.

Die Auswertung der oben bereits angesprochenen Transkriptomanalyse ergab eine auffällige Hochregulation von einigen Genen, die an der Reparatur von DNA-Defekten beteiligt sind, was als ein weiteres Indiz für Fragmentierung von DNA als Folge des N-Glykosylierungsdefekts in *wbp1-1* gelten könnte. Die Genprodukte zweier Gene, *TDPI* und *SHU1*, spielen eine Rolle bei der Reparatur von DNA-Schäden, die durch fehlerhaft arbeitende Topoisomerasen entstehen. Topoisomerasen sind Enzyme, die mittels Einzel- und Doppelstrangbrüche zur Entwirrung der DNA beitragen. Für Tdp1p konnte nachgewiesen werden, dass es eine wichtige Rolle bei der Beseitigung von DNA-Doppelstrangbrüchen spielt, die durch die Topoisomerase I verursacht wurden (Pouliot *et al.*, 2001). Dagegen wurde das Protein Shu1p als Suppressor einer defekten Topoisomerase III identifiziert, das für eine fehlerfreie Reparatur von spontanen und induzierten DNA-Schäden wichtig ist (Shor *et al.*, 2005). *PHR1* kodiert für eine Photolyase, die in der Lage ist, durch ultraviolette Strahlung aus Pyrimidindimeren entstandene Cyclobutanringe, mittels der Energie des sichtbaren Lichtes wieder zu spalten und so die ursprüngliche DNA-Sequenz wieder herzustellen (Green und MacQuillan, 1980). Weitere in Eukaryoten verbreitete DNA-Reparaturmechanismen sind „excision repair“ und „mismatch repair“. Für *MLH2*, das mit *MLH1* einen heterodimeren Komplex bildet, konnte eine Beteiligung am „mismatch repair“ nachgewiesen werden (Wang *et al.*, 1999), wohingegen das für eine Endonuklease kodierende *RAD10*, das einen Komplex mit *RAD1* bildet, Fehler in der DNA mittels „excision repair“ behebt (zusammengefasst in Prakash und Prakash, 2000). Ein weiteres Gen, das durch Induktion des programmierten Zelltods hochreguliert wurde, ist *IMP2*, dessen Transkript nicht direkt an der Reparatur der DNA beteiligt ist, sondern vielmehr als Transkriptionsfaktor aktivierend auf Reparaturgene einwirkt. Viele Gene werden zur Ausbesserung der DNA herangezogen, unabhängig davon, wie die Defekte im Genom entstanden sind. Im Gegensatz dazu scheint Imp2p nur dann DNA-Reparaturgene zu aktivieren, falls durch oxidativen Stress bedingte Einzelstrangbrüche im Genom auftreten (Masson und Ramotar, 1996). Im Laufe der Auswertung der Transkriptomanalyse wurden zwei weitere Gene identifiziert, die bei der Instandhaltung des Genoms eine Rolle zu spielen scheinen, wobei deren exakte Funktion bis jetzt noch nicht verstanden ist. Es konnte gezeigt werden, dass Disruption von *HIM1* nach Behandlung mit verschiedenen mutagenen Substanzen zu einer verminderten Überlebensrate führte (Kelberg *et al.*, 2005) und die SUMO („small ubiquitin-like modifier“) Ligaseaktivität von *MMS21* nicht nur notwendig für DNA-Reparatur sondern auch für Chromatinorganisation ist (Zhao und Blobel, 2005). Um ein funktionelles Genom in der Zelle zu erhalten, ist nicht nur DNA-Reparatur und Chromatinorganisation, sondern auch Stabilisierung und Erhaltung der Telomere von Bedeutung. In Säugerzellen wurde nachgewiesen, dass Apoptose

<b>Gen</b>	<b>Funktion des Genprodukts</b>	<b>wbp1-1 37 °C → WT 37 °C</b>	<b>Veränderung</b>	<b>wbp1-1 37 °C → wbp1-1 25 °C</b>	<b>Veränderung</b>
<i>DIN7</i>	Mitochondrielle Nuklease, die an DNA-Reparatur und Replikation beteiligt ist; moduliert die Stabilität des mitochondrialen Genoms; wird durch Mutagene induziert	2	I	1,2	NC
<i>HIM1</i>	Protein unbekannter Funktion, das eine Rolle bei der DNA-Reparatur spielt	2,3	I	2,6	I
<i>IMP2</i>	Aktivierender Transkriptionsfaktoren; involviert in die Instandhaltung des Ionenhaushalts; schützt die Zelle vor DNA-Schäden, die durch Bleomycin oder andere Oxidationsmittel entstanden sind	2,1	I	2,5	I
<i>MLH2</i>	Protein ist am "mismatch repair" von bestimmten "frameshift" Zwischenprodukten beteiligt	2	I	1,4	I
<i>MMS21</i>	SUMO Ligase involviert in Chromosomenorganisation und DNA-Reparatur; Mutanten weisen eine erhöhte Rate spontaner Mutationen auf	2,6	I	4,3	I
<i>PBP2</i>	Spielt bei der Regulation von Position und Länge der Telomeren eine Rolle	3,5	I	1,2	NC
<i>PHR1</i>	DNA-Photolyase beteiligt an Photoreaktivierung; repariert Pyrimidindimere im sichtbaren Licht; Expression wird durch DNA-Schäden induziert	3,5	I	1,9	I
<i>RAD10</i>	Einzelstrang DNA-Endonuclease; schneidet einzelsträngige DNA während dem "excision repair" von Nukleotiden und während der Reparatur von Doppelstrangbrüchen; Untereinheit des "Nucleotide Excision Repair Factor 1" (NEF1)	2,3	I	2,6	I
<i>SOH1</i>	Soh1p zeigt geringe Ähnlichkeit zu RNA-Polymerasen und interagiert in einem "two-hybrid assay" mit dem DNA-Reparaturprotein Rad5p	2,8	I	1,6	I
<i>SHU1</i>	Protein mit unbestimmter Funktion; spielt eine Rolle bei der Suppression von Mutationen; wird für fehlerfreie Reparatur spontaner und induzierter DNA-Läsionen benötigt, um das Genom vor Mutationen zu schützen	2,3	I	1,9	I
<i>TDP1</i>	Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase I, hydrolysiert 3'-Phosphotyrosylbindungen um 3'-Phosphat-DNA und Tyrosin zu generieren; ist involviert in die Reparatur von Läsionen, die durch die Topoisomerase I entstanden sind	2,3	I	1,7	I
<i>TOP3</i>	DNA-Topoisomerase III	2	I	3	I

**Tabelle II.3: Zusammenfassung der hochregulierten Gene, die in DNA-Reparatur und Erhaltung der Telomere involviert sind.**

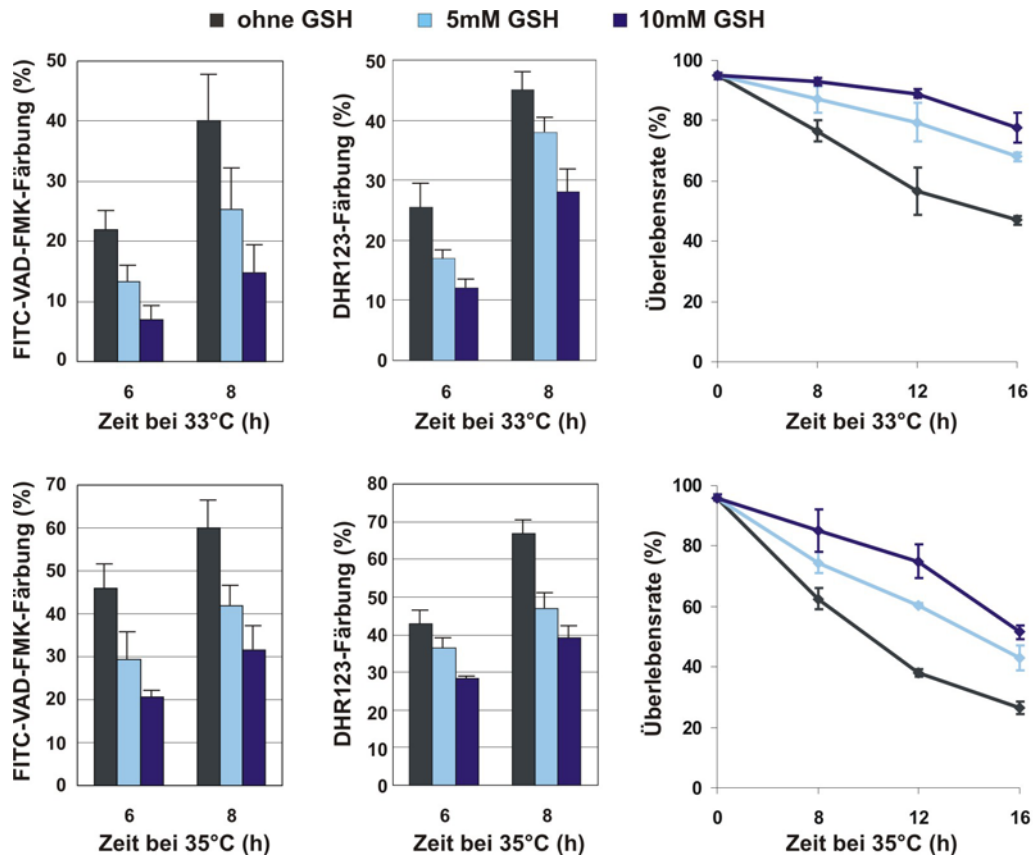
induziert werden kann, falls die Verkürzung der Telomeren ein kritisches Niveau erreicht (Herbert *et al.*, 1999). Gegensätzlich dazu konnte eine Verringerung der Telomerenlänge nach Induktion von Apoptose durch Schädigung der DNA mittels Camptothecin (Hemmstoff der Topoisomerase I) nachgewiesen werden (Ramirez *et al.*, 2003). In Hefe konnte bis jetzt noch kein Zusammenhang zwischen Schädigung der DNA und einer daraus resultierenden reduzierten Länge der Telomere festgestellt werden. Falls jedoch die durch defekte N-Glykosylierung induzierte Fragmentierung der DNA sich auf die Beschaffenheit der Telomere auswirkt, könnte das die Hochregulation der drei Gene *PBP2*, *SOH1* und *TOP3*, die an der Instandhaltung der Telomere beteiligt sind, erklären.

Ein weiteres Gen, das an der Reparatur und Instandhaltung nicht des nukleären, sondern des mitochondriellen Genoms beteiligt ist, kodiert für die mitochondrielle Nuklease Din7p. Es wurde nachgewiesen, dass Inkubation von Hefezellen mit DNA-schädigenden Agenzien, wie UV Licht, MMS (Methylmethansulfonat) oder Hydroxyurea eine starke Hochregulation von *DIN7* zur Folge hatte (Mieczkowski *et al.*, 1997). Somit scheint durch Induktion von Apoptose nicht nur das nukleäre Genom, sondern auch das mitochondrielle geschädigt worden zu sein.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in der *wbp1-1* Mutante nach Induktion des PCD durch einen Defekt in der N-Glykosylierung DNA-Fragmentierung auftrat, was sowohl durch den TUNEL-Test (Abb. I.5D-F) als auch durch die Transkriptomanalyse gezeigt werden konnte.

### **II.1.1.5 Reduktion reaktiver Sauerstoffspezies durch die Antioxidantien Glutathion und N-Acetyl-L-Cystein**

Das Tripeptid Glutathion (GSH), ein Antioxidationsmittel, spielt in seiner reduzierten Form in der Zelle eine sehr wichtige Rolle bei der Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies. Ebenso schützt es SH-Gruppen cytoplasmatischer Proteine vor Oxidation. In *S. cerevisiae* wurde festgestellt, dass durch Zugabe von GSH zu einer wachsenden Kultur sich die Lebensdauer der Zellen durch Reduktion entstandener Superoxidradikalanionen verlängert (Heeren *et al.*, 2004). Wie aus Abbildung II.6 deutlich wird, führte die Zugabe von 5 mM bzw. 10 mM reduziertem GSH zu einer starken Abnahme an reaktiven Sauerstoffspezies (Abb. II.6, mittlere Balkendiagramme). Bei einer Inkubationstemperatur von 33 °C wurde eine ROS-Reduktion von 25% auf 12% (10 mM) nach 6 h Inkubation und von 45% auf 27% (10 mM) nach 8 h Inkubation bei restriktiver Temperatur erzielt. Auch bei der höheren Inkubationstemperatur von 35 °C verminderte sich die Anzahl an ROS-positiven Zellen von 43% auf 28% (10 mM) nach 6 h bzw. von 67% auf 39% nach 8 h Inkubation. Eine weitere Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 37 °C führte zur Verminderung der reduzierenden Wirkung von GSH, da nach 4h bei 37 °C die Anzahl ROS-positiver Zellen nur um 8%, von 40% auf 32% bei Zugabe von 10 mM GSH, minimiert werden konnte (Ergebnis nicht graphisch dargestellt). Da in *wbp1-1* bei restriktiver Inkubationstemperatur von 37 °C vermutlich ein größerer ER-Stress und eine damit verbundene höhere Konzentration an ROS im Vergleich zu 33 °C oder 35 °C zu erwarten ist,

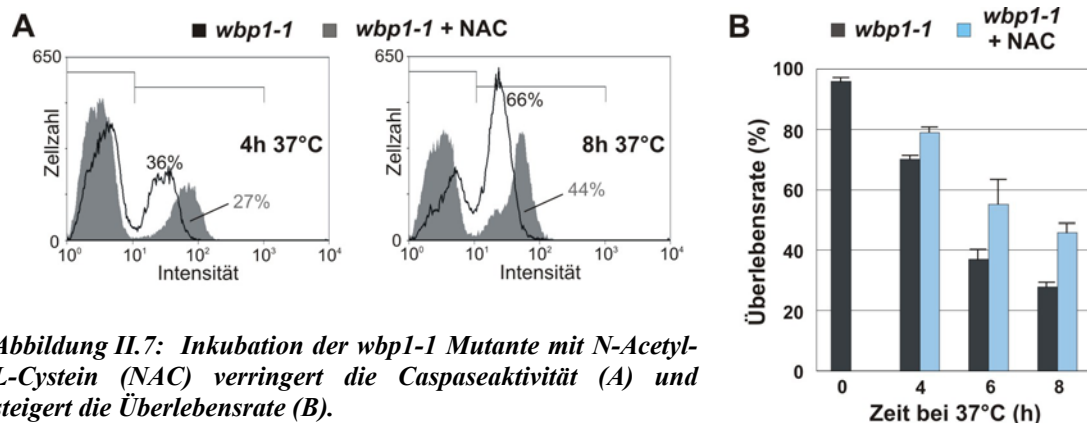


**Abbildung II.6: Reduziertes Glutathion vermindert ROS-Akkumulation und Caspaseaktivität und erhöht die Überlebensrate der *wbp1-1* Mutante.**

Kulturen der *wbp1-1* Mutante wurden für 6 und 8 h bei restriktiver Temperatur inkubiert und Caspaseaktivität nach FITC-VAD-FMK Färbung (linke Balkendiagramme) bzw. ROS-Akkumulation nach Inkubation der Zellen mit DHR123 (mittlere Balkendiagramme) mittels Durchflußzytometrie nachgewiesen. Um die Überlebensrate zu untersuchen, wurden die Kulturen für 8, 12 und 16 h bei restriktiver Temperatur inkubiert und anschließend Einzelzellen mit Hilfe des Zellsorters auf Petrischalen plattiert (rechte Diagramme). Die restriktive Temperatur für die Experimente in der oberen Reihe betrug 33 °C, in der unteren 35 °C.

konnte das zugesetzte GSH die Reduktion der gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies nicht mehr in ausreichendem Maße bewerkstelligen. In einem weiteren Experiment wurde ein möglicher Effekt von GSH auf die Caspaseaktivität analysiert. Auch hier zeigte sich eine starke Abnahme der Caspaseaktivität durch Zugabe von 10 mM GSH ins Medium: bei 33 °C von 22% auf 7% (nach 6 h) und von 40% auf 25% (nach 8 h). Bei einer Inkubationstemperatur von 35 °C wurde ebenso Caspaseaktivität von 46% auf 20% (nach 6 h) und 60% auf 31% (nach 8 h) minimiert (Abb. II.6, linke Balkendiagramme). GSH verbesserte außerdem die Überlebensrate der Kulturen (Abb. II.6, rechte Diagramme). Beispielsweise waren nach 12 h bei einer Inkubationstemperatur von 33°C nur noch 56% der Zellen in der Lage zur Kolonie heranzuwachsen, wohingegen in Anwesenheit von 10 mM GSH die Überlebensrate 89% betrug. Bei 35 °C wurde die Überlebensrate nach 12 h Inkubation von 38% auf 75% nahezu verdoppelt.

Ein weiteres Antioxidationsmittel, das zur Reduktion reaktiver Sauerstoffspezies eingesetzt wird, ist *N*-Acetyl-L-Cystein (NAC). NAC, das von Säugerzellen besser aufgenommen wird als Cystein, kann in der Zelle in eben dieses umgewandelt werden. Da für die Bildung von Glutathion neben den Aminosäuren Glutamat und Glycin Cystein benötigt wird, welches den limitierenden Faktor darstellt, kann durch exogene Gabe von *N*-Acetyl-L-Cystein eine Zunahme der GSH-Konzentration erreicht werden, wie in Lymphozyten nachgewiesen wurde (Gross *et al.*, 1993). Aufgrund dieser Wirkung konnte außerdem gezeigt werden, dass NAC in der Lage ist, PCD in Säugerzellen zu verzögern (Mayer und Noble, 1994). Durch Zugabe von 10 mM NAC zu einer wachsenden *wbp1-1* Kultur wurde die Anzahl an Caspase-positiven Zellen nach Inkubation bei 37 °C von 36% auf 27% (nach 4 h) und



**Abbildung II.7:** Inkubation der *wbp1-1* Mutante mit *N*-Acetyl-L-Cystein (NAC) verringert die Caspaseaktivität (A) und steigert die Überlebensrate (B).

A: Die Kulturen wurden für 4 und 8 h bei 37 °C ohne (schwarz) bzw. mit 10 mM NAC (grau) inkubiert, anschließend mit FITC-VAD-FMK gefärbt und Caspaseaktivität durchflußzytometrisch analysiert.  
B: Die Zellen wurden für 4, 6 und 8 h bei 37 °C ohne (Anthrazit) und mit NAC (hellblau) inkubiert und nach dem Ernten mittels eines Zellsorters plattiert.

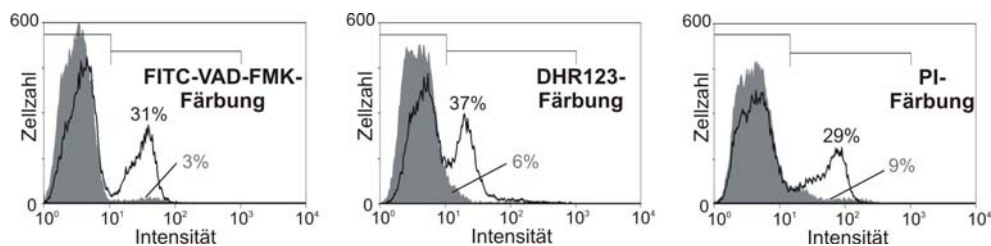
von 66% auf 44% (nach 8 h) reduziert (Abb. II.7A). Ebenso vermochten mit NAC supplementierte Kulturen besser zu überleben, wie in Abbildung II.7B dargestellt ist. Der antioxidative Effekt von NAC zeigte nach Analyse der Caspaseaktivität, vor allem aber bei der Überlebensrate, eine geringere Wirkung im Vergleich zu GSH. Dies könnte auf die wie oben bereits diskutierte höhere Inkubationstemperatur von 37 °C und einer damit einhergehenden höheren ROS-Konzentration in den Zellen zurückzuführen sein.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Induktion des PCD direkt von der Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies in der Zelle abhängig ist. Nach Zugabe der Antioxidationsmittel GSH und NAC wurde nicht nur eine verminderte ROS-Akkumulation, sondern eine davon abhängige Reduktion der Caspaseaktivität und Zunahme der Überlebensrate nachgewiesen.



### II.1.1.6 Programmierter Zelltod ist abhängig von der Proteinneusynthese

Im Jahre 1997 wurde in verschiedenen Säugerzelllinien, später auch in *S. cerevisiae*, nachgewiesen, dass durch Hemmung der Proteinbiosynthese mittels Cycloheximid (CH) Apoptose verhindert werden kann (Hiraoka *et al.*, 1997; Sanchez *et al.*, 1997). Nach Induktion von Apoptose mittels Wasserstoffperoxid (Madeo *et al.*, 1999) oder Essigsäurestress (Ludovico *et al.*, 2001) konnte das Auftreten typischer apoptotischer Merkmale durch Zugabe von Cycloheximid stark reduziert werden. Es sollte im Folgenden untersucht werden, inwieweit Proteinneusynthese auch in der apoptotischen Signalkaskade ausgelöst durch defekte N-Glykosylierung eine Rolle spielt. Aus Abbildung II.8 wird ersichtlich, dass sowohl Caspaseaktivität (von 31% auf 3%) und ROS-Produktion (von 37% auf 6%) als auch die Färbung der Zellen mit PI (von 29% auf 9%) durch den Zusatz von CH ins Inkubationsmedium drastisch reduziert ist. Dies ist ein deutliches Indiz dafür, dass es sich hierbei nicht um Nekrose, sondern um programmierten Zelltod handelt. Sowohl für die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies als auch für die Aktivierung von Caspasen sind Proteine notwendig, deren



**Abbildung II.8: Caspaseaktivität, ROS-Akkumulation und der Verlust der Plasmamembranintegrität sind von der Proteinneusynthese abhängig.**

Kulturen der *wbp1-1* Mutante wurden für 4 h bei 37 °C ohne (schwarz) und mit (grau) 50 µg/ml Cycloheximid inkubiert und mittels Durchflußzytometrie analysiert.

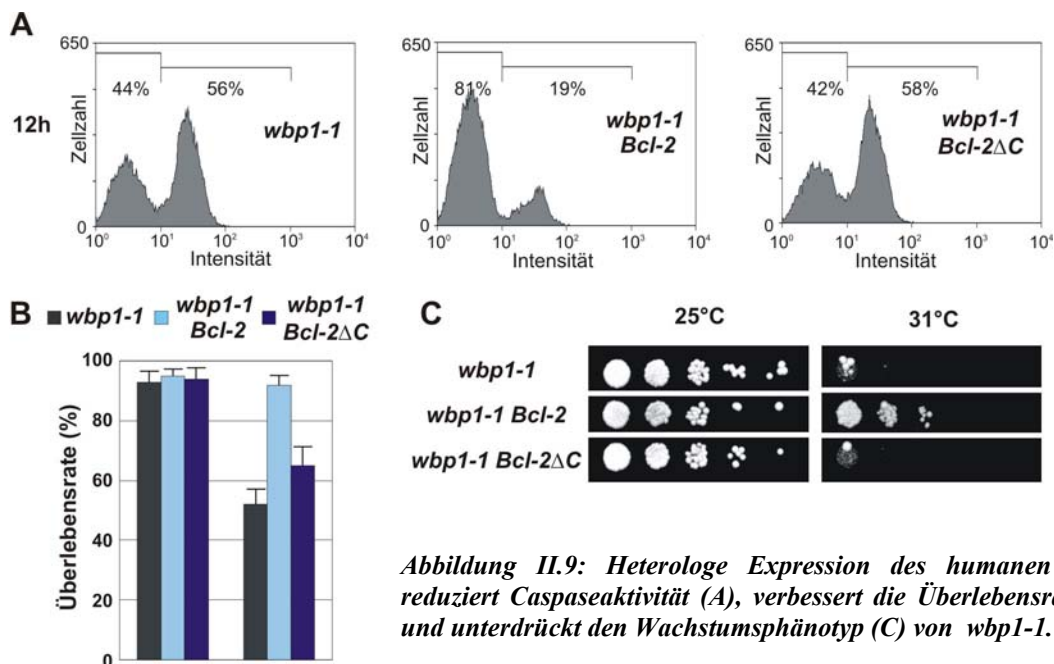
Expression durch den Defekt in der N-Glykosylierung angeschaltet wurde. Da Nekrose keine Proteinneusynthese benötigt, konnte nach Behandlung der Zellen mit CH und einer daraus resultierenden Reduktion PI-positiver Zellen nachgewiesen werden, dass der nekrotische Zustand dieser Zellen durch Induktion des programmierten Zelltods, wie schon unter II.1.1.1 vermutet, erreicht wurde. Andernfalls wäre eine unveränderte Anzahl an PI-positiven Zellen zu erwarten gewesen.



### II.1.1.7 Überexpression des humanen anti-apoptotischen Faktors *Bcl-2*

Die Mitglieder der *Bcl-2* Familie spielen in Säugern bei der Regulation des programmierten Zelltods eine wichtige Rolle. Zu dieser Familie gehören sowohl pro- als auch anti-apoptotische Proteine. Sie wurden bis jetzt in vielen verschiedenen Organismen, nicht jedoch in der Bäckerhefe, nachgewiesen. Durch Überexpression des humanen pro-apoptotischen Faktors Bax konnte jedoch in *S. cerevisiae* eine Induktion des programmierten Zelltods nachgewiesen werden, wohingegen Co-Expression der humanen anti-apoptotischen Faktoren *Bcl-2* und *Bcl-x<sub>L</sub>* diesen Prozess inhibierten (Hanada *et al.*, 1995). Überexpression des humanen *Bcl-2* führte außerdem in der in der mitochondriellen Teilung defekten *fis1* Mutante zu reduziertem Zelltod (Fannjiang *et al.*, 2004) und verbesserte die Überlebensrate in einer Superoxiddismutase-defizienten Mutante (Longo *et al.*, 1997). Dies deutet darauf hin, dass in *S. cerevisiae* Proteine, die eine pro- oder anti-apoptotische Funktion aufweisen und der *Bcl-2* Familie in der Funktion ähnlich sind, während der Evolution konserviert wurden.

Die heterologe Expression des humanen pro-apoptotisch wirkenden Faktors *Bcl-2* in *wbp1-1* hatte nach einem „ts-Shift“ auf 37 °C für 12 h eine Verringerung der Caspaseaktivität von 56% auf 19% zur



**Abbildung II.9:** Heterologe Expression des humanen *Bcl-2* reduziert Caspaseaktivität (A), verbessert die Überlebensrate (B) und unterdrückt den Wachstumsphänotyp (C) von *wbp1-1*.

A: Analyse der Caspaseaktivität in *wbp1-1* nach heterologer Expression von *Bcl-2* und *Bcl-2ΔC* im Vergleich zu *wbp1-1* mittels Durchflußzytometrie. Die Zellen wurden für 12 h bei einer restriktiven Temperatur von 37 °C in YPG inkubiert.

B: Überlebensrate nach Umsetzen der Kulturen für 12 h auf 37 °C.

C: 3 µl einer 1:10 Verdünnungsreihe startend mit 10<sup>6</sup> Zellen wurden auf YPG-Platten getüpfelt und 4 Tage bei 25 °C und 31 °C inkubiert.

Folge (Abb. II.9A). Als Kontrolle wurde in *wbp1-1* ein vom C-Terminus deletiertes, nicht funktionelles *Bcl-2*, das als *Bcl-2ΔC* bezeichnet wurde, exprimiert. Da *Bcl-2* und *Bcl-2ΔC* unter der Kontrolle eines durch Galaktose induzierbaren Promoters standen, wurden die Kulturen in YPG

angezogen. Die Verwendung von Galaktose anstelle von Glukose als Kohlenstoffquelle führte jedoch zu einem verlangsamten Wachstum der Kulturen, weshalb die Zellen für eine längere Zeit auf die restriktive Temperatur umgesetzt werden mussten, um ähnliche Werte für Caspaseaktivität oder Überlebensrate zu erzielen. Die Überexpression von *Bcl-2* hatte nicht nur Auswirkungen auf die Caspaseaktivität sondern auch auf die Überlebensrate von *wbp1-1*. Die Überlebensrate der Mutante stieg von 52% auf 92%, wobei die Überexpression der nicht funktionellen *Bcl-2*-Varinate keinen Effekt aufwies (Abb. II.9.B). Wie in einem Vorversuch nachgewiesen werden konnte, war *wbp1-1* in der Lage bei Inkubationstemperaturen von 25 °C bis 30 °C auf YPG-Agarplatten zu wachsen, wobei nach Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 31 °C ein Wachstumsphänotyp auftritt. Aufgrund dessen wurde in einem weiteren Experiment hinterfragt, ob die in *wbp1-1* auftretende anti-apoptotische Wirkung von *Bcl-2* den Wachstumsphänotyp bei 31 °C unterdrücken könnte. Wie Abbildung II.9C zeigt, vermochte lediglich *wbp1-1 Bcl-2* bei 31 °C zu wachsen, wozu *wbp1-1* und *wbp1-1 Bcl-2ΔC* nicht in der Lage waren.

Die Ergebnisse veranschaulichen, dass durch die anti-apoptotische Wirkung des humanen *Bcl-2*, nicht aber durch *Bcl-x<sub>L</sub>* (letzteres Ergebnis nicht gezeigt), der Zelltod vermindert werden konnte, was auf eine Präsenz von *Bcl-2*-ähnlichen Proteinen in *S. cerevisiae* hindeutet. Da in Säugern die beiden anti-apoptotischen Proteine, *Bcl-x<sub>L</sub>* und *Bcl-2*, durch Interaktion mit den pro-apoptotischen Proteinen *Bax* und *Bak* deren Lokalisation an Mitochondrien verhindern und dadurch zur Hemmung der intrinsischen apoptotischen Signalkaskade beitragen, ist es verwunderlich, dass in *wbp1-1* nur ein Effekt nach *Bcl-2* Überexpression festgestellt werden kann. Dies ist möglicherweise damit zu erklären, dass im Säuger *Bcl-2*, nicht aber *Bcl-x<sub>L</sub>*, auch in die Signalkaskade ausgelöst durch ER-Stress involviert ist (Abb. I.1). Somit besteht die Möglichkeit, dass während der Evolution in Hefe ein Protein konserviert wurde, dessen anti-apoptotische Funktion am ER, nicht aber an den Mitochondrien, durch das humane *Bcl-2* übernommen werden kann, was wie in Abb. II.9 gezeigt, zur Hemmung des PCD in *S. cerevisiae* beiträgt.

### II.1.1.8 Osmotische Stabilisierung von *wbp1-1* durch Sorbit

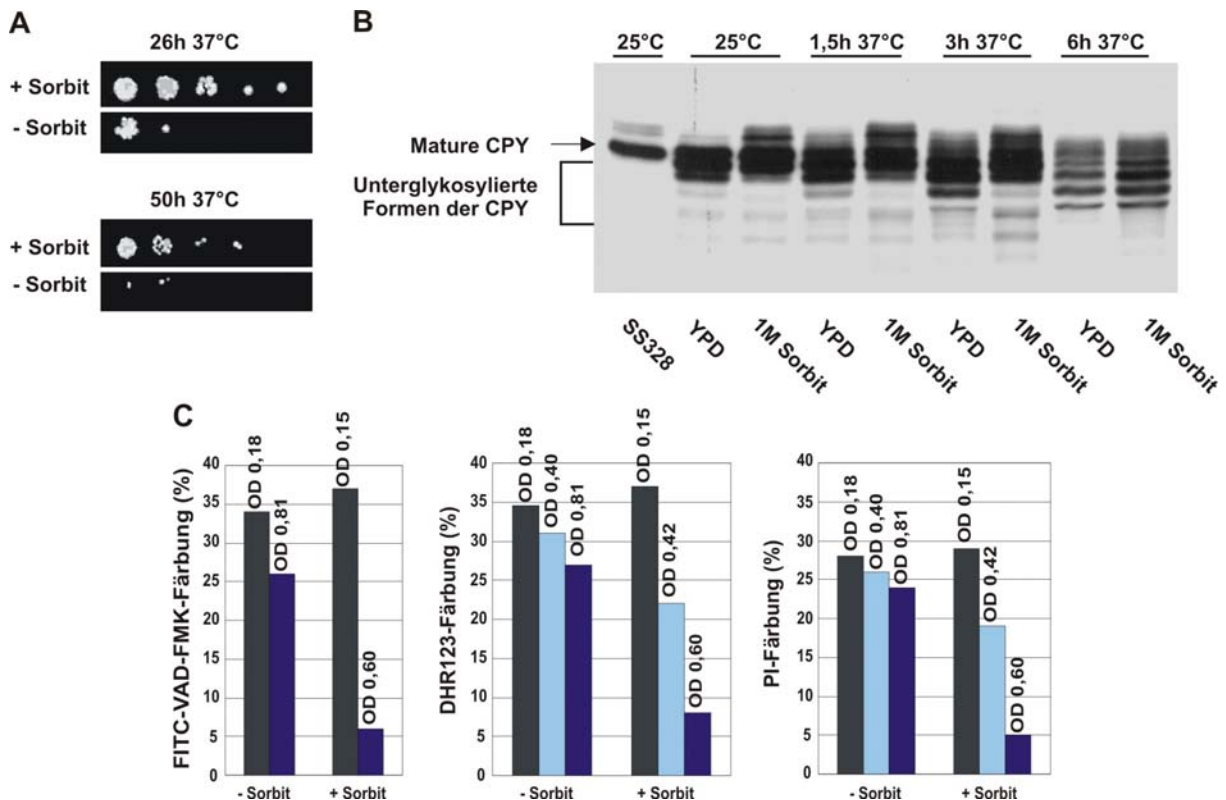
Defekte in der Protein N-Glykosylierung können zu Problemen bei der Erhaltung der Zellwandintegrität führen. Dies kann jedoch durch osmotische Stabilisierung mittels Zugabe hoher Salzkonzentrationen oder 1 M Sorbit zum Inkubationsmedium verhindert werden (Heinisch *et al.*, 1999; Lesage und Bussey, 2006). Aus Abbildung II.10A wird ersichtlich, dass der Zusatz von 1 M Sorbit ins Inkubationsmedium/-platten ein deutlich besseres Wachstum der *wbp1-1* Mutante nach sich zog, wie es auch für die *ost2* Mutante nachgewiesen worden war (Sugiura und Takagi, 2006). Das Ergebnis zeigt, dass die Induktion des N-Glykosylierungsdefekts in *wbp1-1* und der damit einhergehende zunehmende Verlust der Zellwandintegrität nach einem „ts-Shift“ von 26 h auf 37 °C durch 1 M Sorbit osmotisch stabilisiert werden konnte (Abb. II.10A, oben). Mit zunehmendem Stress, der durch Verlängerung der Inkubationszeit bei restriktiver Temperatur induziert wurde, reduzierte sich jedoch auch die stabilisierende Wirkung des Sorbits (Abb. II.10A, unten). In einem weiteren Experiment wurde untersucht, inwieweit der Zusatz von 1 M Sorbit Auswirkungen auf die Unterglykosylierung in *wbp1-1* hat. Hierfür wurde *wbp1-1* mit und ohne 1 M Sorbit für unterschiedliche Zeitpunkte bei restriktiver Temperatur inkubiert und die Neusynthese der Carboxypeptidase Y (CPY), einem Protein mit vier N-Glykosylierungsstellen, mittels radioaktiver Markierung mit [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein untersucht. Im Vergleich zum isogenen Wildtyp (Abb. II.10B, Spur 1) zeigte *wbp1-1* bereits bei einer Inkubationstemperatur von 25 °C drei verschiedene glykosylierte Formen der CPY, die mature und zwei unterglykosylierte Formen, die nur zwei bzw. drei N-glykosylierte Zuckerketten besaßen. Je länger die Kulturen bei restriktiver Temperatur inkubiert wurden, desto stärker wurde der Glykosylierungsdefekt in der CPY sichtbar (Abb. II.10B, Spur 8 zeigt alle vier möglichen unterglykosylierte Formen). Im Vergleich dazu führte osmotische Stabilisierung nach kurzem „ts-Shift“ zu einer geringen Verbesserung der Unterglykosylierung (Abb. II.10B, Vergleich der Spuren 2 ↔ 3, 4 ↔ 5, 6 ↔ 7), wohingegen nach 6 h bei restriktiver Temperatur, unabhängig vom Inkubationsmedium, das gleiche Unterglykosylierungsmuster ermittelt wurde (Abb. II.10B, Spur 8 ↔ 9). Ein weiterer Hinweis für eine Störung der Zellwandintegrität in N-Glykosylierungsdefekten Mutanten wurde aus der Literatur erhalten. Bulik und Mitarbeiter untersuchten Mutanten mit N-Glykosylierungsdefekten auf deren Chitinkonzentration und stellten fest, dass deren Chitingehalt mindestens um das dreifache erhöht war, womit der Zellwand Stabilität verliehen werden sollte (Bulik *et al.*, 2003). Dass dies möglicherweise auch auf die *wbp1-1* Mutante zutrifft, kann indirekt durch die Ergebnisse der Transkriptomanalyse belegt werden. Neben *CHS1*, das für die Chitinsynthase I kodiert, wurden zwei weitere Gene, *CHS6* und *BUD7*, die am spezifischen Export der Chitinsynthase Chs3p vom Golgi zur Plasmamembran beteiligt sind, nach Induktion des N-Glykosylierungsdefekts hochreguliert. Für eine Störung der Zellwandintegrität spricht ebenso die verstärkte Transkription der Zellwandproteine Yps3p und Yps6p oder von Proteinen, die an der Zellwandbiosynthese beteiligt sind, wie Ktr2p und Kre11p. In der Transkriptomanalyse wurden

Gen	Funktion des Genprodukts	wbp1-1 37 °C → WT 37 °C	Veränderung	wbp1-1 37 °C → wbp1-1 25 °C	Veränderung
<i>BUD7</i>	vermittelt den Transport von spezifischen Transportproteinen vom Golgi zur Plasmamembran, darunter die Chitinsynthase Chs3p	2,5		1,9	
<i>CHS1</i>	Chitinsynthase I; katalysiert den Transfer von N-Acetylglukosamin (GlcNAc) auf Chitin; notwendig für die Reparatur des Chitinseptums während der Zytokinese	2,6		2,3	
<i>CHS6</i>	vermittelt den Transport von spezifischen Transportproteinen vom Golgi zur Plasmamembran, darunter die Chitinsynthase Chs3p	2,1		1,5	
<i>FRT2</i>	In der ER-Membran verankertes Membranprotein; vermittelt das Wachstum während Zellwandstress	3,5		3,5	
<i>HLR1</i>	Spielt eine Rolle bei der Regulation der Zellwandzusammensetzung, Zellwandintegrität und bei der Regulation von osmotischem Stress	3,2		1,9	
<i>KRE11</i>	Involviert in der biosynthetischen Herstellung von Zellwand-β-glukanen	2,1		2,3	
<i>KTR2</i>	Mannosyltransferase	2,8		3	
<i>SIP18</i>	Protein unbekannter Funktion, dessen Expression durch osmotischen Stress induziert wird	2		5,3	
<i>YBR053C</i>	mögliches Protein unbekannter Funktion; wird durch Störung der Zellwandintegrität induziert	2,5		1,6	
<i>YBR071W</i>	Protein unbekannter Funktion; Expression könnte durch Zellwandstress reguliert werden	4		4,6	
<i>YPS1</i>	Aspartatprotease; mit einem Glykosylphosphatidylinositol (GPI) Anker in der Plasmamembran verankert	2,6		2,1	
<i>YPS3</i>	Aspartatprotease; mit einem Glykosylphosphatidylinositol (GPI) Anker in der Plasmamembran verankert	3		3,5	
<i>YPS5</i>	Protein zeigt Ähnlichkeit zu mit einem Glykosylphosphatidylinositol (GPI) Anker in der Plasmamembran verankerten Aspartatproteasen wie Yap1p und Yap3p	3		2,8	
<i>YPS6</i>	Aspartatprotease; mit einem Glykosylphosphatidylinositol (GPI) Anker in der Plasmamembran verankert	3,5		6	

**Tabelle II.4: Zusammenfassung der Gene, die aufgrund von Zellwandstress hochreguliert wurden.**

zwei weitere Proteine identifiziert, deren Expression hochreguliert wurde, die mit einem GPI Anker in der Zellwand verankerten Aspartatproteasen Yps1p und Yps5p. Des Weiteren wurden Proteine identifiziert, die für die Zellwandintegrität eine Rolle spielen (*HLR1*, *FRT2*) und deren Expression durch osmotischen Stress induziert wurde (*YBR071W*, *YBR053C*, *SIP18*).

Aufgrund der oben dargelegten Ergebnisse wurde in weiteren Experimenten untersucht, wie sich die stabilisierende Wirkung von Sorbit auf Caspaseaktivität, ROS-Produktion und PI-Färbung der Zellen auswirkte und ob dies von der optischen Dichte der Kulturen zum Zeitpunkt der Stressinduktion



**Abbildung II.10: Osmotische Stabilisierung der *wbp1-1* Mutante durch Sorbit ist stark abhängig von der Wachstumsphase der Kultur zum Zeitpunkt des „Temperaturshifts“.**

**A:** Die Kulturen wurden bei 25 °C in YPD +/- 1M Sorbit angezogen, 26 h bzw. 50 h bei 37 °C inkubiert, 3 µl einer 1:10 Verdünnungsreihe startend mit 10<sup>6</sup> Zellen auf Platten mit YPD +/- 1M Sorbit getüpfelt und für 4 Tage bei 25°C inkubiert.

**B:** Radioaktive Markierung der Carboxypeptidase Y mit [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein. Die OD<sub>600</sub> zum Zeitpunkt des „Temperaturshift“ betrug für *wbp1-1* ohne Sorbit 1,8, mit Sorbit 2,7. Von links: Spur 1, Wildtypkontrolle SS328 in YPD; Spur 2, 4, 6, 8, *wbp1-1* in YPD; Spur 3, 5, 7, 9, *wbp1-1* in YPD plus 1 M Sorbit. Die Zellen wurden für die angegebenen Zeiten bei angegebener Temperatur inkubiert.

**C:** Durchflußzytometrische Analyse der Caspaseaktivität (links), ROS-Produktion (Mitte) und PI-Färbung (rechts) von *wbp1-1* inkubiert in YPD +/- 1 M Sorbit in Abhängigkeit von der optischen Dichte zum Zeitpunkt des „Temperaturshifts“ (Anthrazit = niedrige OD<sub>600</sub>, hellblau = mittlere OD<sub>600</sub>, dunkelblau = hohe OD<sub>600</sub>). Die Kulturen wurden ÜN bei 25 °C in den entsprechenden Medien angezogen und anschließend für 4 h bei restriktiver Temperatur inkubiert. Dieses Experiment wurde einmal durchgeführt.

abhängig war. Die Kulturen der *wbp1-1* Mutante wurden in YPD ohne Sorbit ÜN bei 25 °C auf eine OD<sub>600</sub> von 0,18, 0,40 und 0,81, in Medium mit Sorbit auf eine OD<sub>600</sub> von 0,15, 0,42 und 0,60 angezogen. Anschließend wurden die Kulturen für 4 h bei 37 °C inkubiert und die Zellen mit den

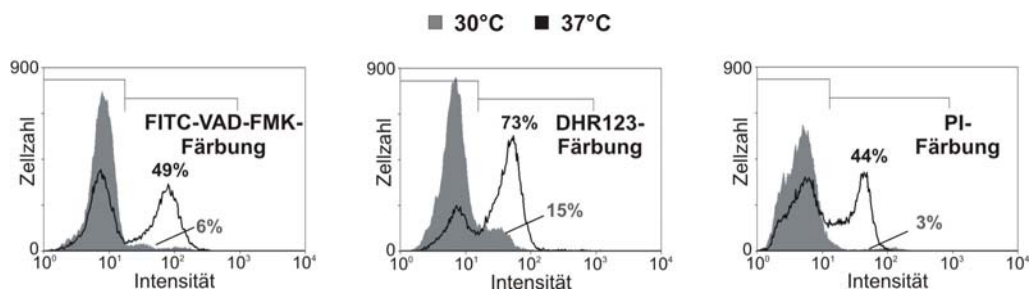
entsprechenden Farbstoffen angefärbt. In den Kulturen, die bei einer  $OD_{600}$  zwischen 0,60 und 0,81 auf die restriktive Temperatur umgesetzt worden waren, wurden die analysierten Phänotypen durch Zellwandstabilisierung mittels Sorbit reduziert (Abb. II.10C, dunkelblaue Balken). Dagegen veränderten sich bei Kulturen, die bei niedriger  $OD_{600}$  umgesetzt (Abb. II.10C, anthrazitfarbene Balken) und in sorbithaltigem Medium inkubiert worden waren, weder Caspaseaktivität, ROS-Akkumulation noch die Anzahl an PI-positiven Zellen.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Wachstumsphase der Kulturen eine wichtige Rolle bei der Induktion des programmierten Zelltods einnimmt oder sich auf irgendeine Art und Weise auf die Zellwandintegrität auswirkt. Obwohl die Unterschiede in den Wachstumsstadien der Kulturen sehr gering waren, hatten sie große Auswirkungen auf die analysierten apoptotischen Marker. Wie jedoch die Signalkaskade des PCD letztendlich ausgelöst wird und wie die Wachstumsphase der Kulturen dafür ausschlaggebend ist konnte in dieser Arbeit nicht ermittelt werden.

## II.1.2 Hemmung der N-Glykosylierung im Wildtyp durch Tunicamycin induziert PCD

### II.1.2.1 Inkubation der Kulturen mit Tunicamycin induziert Caspaseaktivität, ROS-Akkumulation und PI-Färbung im Wildtyp SS328

Wie in Abschnitt II.1.1 gezeigt wurde, führte die Induktion des N-Glykosylierungsdefekts in *wbp1-1* zum Auftreten apoptotischer Phänotypen. Aufgrund dessen wurde nachfolgend untersucht, ob die Hemmung der N-Glykosylierung durch Tunicamycin (TM) im Wildtyp ebenso eine Induktion des PCD zur Folge hatte. Tunicamycin ist ein Antibiotikum, das erstmals aus *Streptomyces lysosuperficus* isoliert wurde. Es ist ein Inhibitor bakterieller und eukaryotischer N-Acetylglukosamintransferasen und blockiert dadurch unter anderem den Transfer von N-Acetylglukosamin-1-phosphat auf Dolicholmonophosphat, was dazu führt, dass keine N-glykosidische Modifikation von Proteinen stattfinden kann (Lehle und Tanner, 1976).



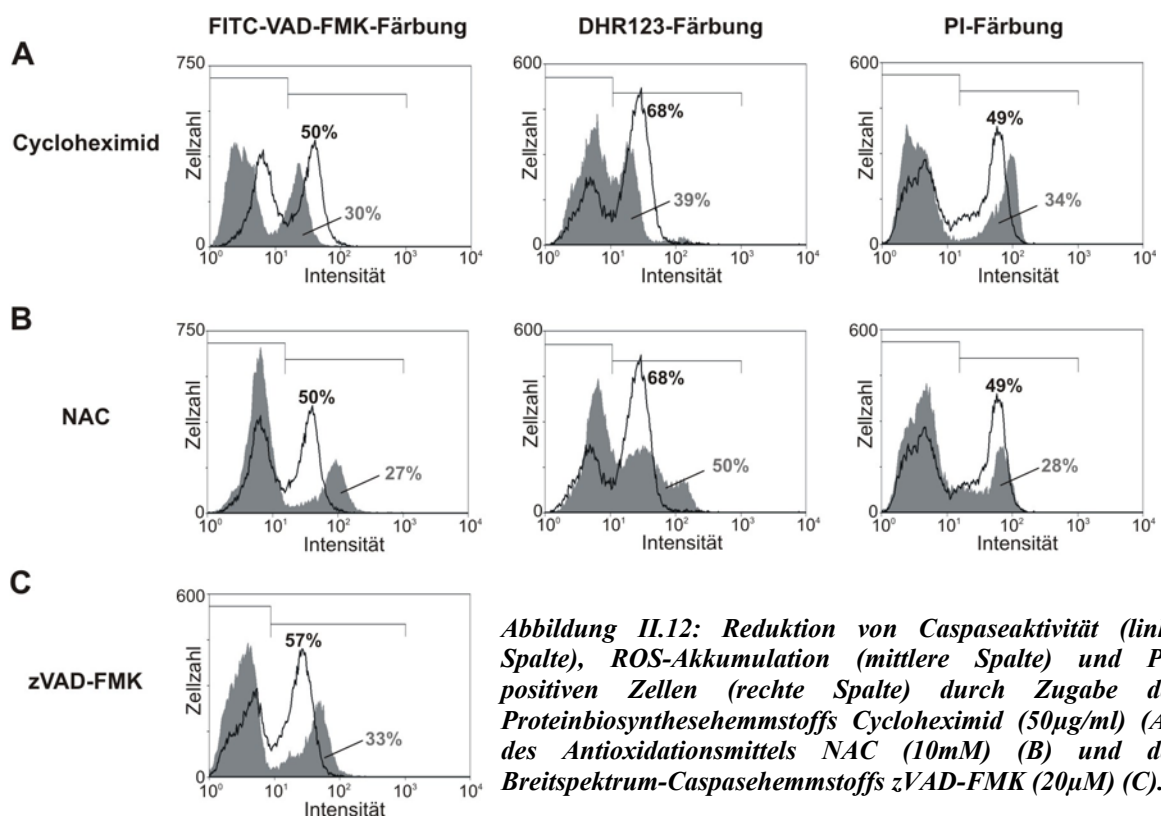
**Abbildung II.11: Hemmung der Protein N-Glykosylierung durch Tunicamycin im Wildtyp SS328.**

Die Kulturen wurden bei 25 °C angezogen und für 8 h bei 30 °C (grau) bzw. 37 °C (schwarz) mit 10 µg/ml Tunicamycin inkubiert. Anschließend wurde mittels Durchflußzytometrie Caspaseaktivität, ROS-Produktion und PI-Färbung der Zellen detektiert.

Abbildung II.11 zeigt, dass die Zellen trotz Hemmung der Protein-N-Glykosylierung bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C keine starke Zunahme der analysierten Phänotypen aufwiesen (ohne TM kultivierte Zellen waren ungefärbt, Ergebnis nicht gezeigt). Es wurde lediglich ein leichter Anstieg der ROS-Produktion von 1% auf 15% beobachtet. Dagegen konnte durch eine Erhöhung der Inkubationstemperatur von 30 °C auf 37 °C eine Steigerung der Caspaseaktivität von 6% auf 49%, der ROS-Akkumulation von 15% auf 73% und der PI-Färbung von 3% auf 44% detektiert werden. Ferner nahm die Anzahl ROS-akkumulierender und PI-positiver Zellen mit der Inkubationszeit zu (Ergebnisse nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass für die Induktion des programmierten Zelltods neben der Hemmung der N-Glykosylierung durch Tunicamycin ein zusätzlicher Temperaturstimulus notwendig ist.

### II.1.2.2 Reduktion von Phänotypen des programmierten Zelltods durch Zusatz unterschiedlicher Additiva

Wie schon für *wbp1-1* gezeigt werden konnte, bewirkte die Hemmung der Proteinneusynthese, der Zusatz der Antioxidationsmittel wie GSH und NAC oder die Inkubation der Zellen mit dem Breitspektrum Caspaseinhibitor zVAD-FMK (Abb. II.1E) eine Reduktion von Merkmalen des programmierten Zelltods. Aufgrund dessen wurde nachfolgend untersucht, ob dies auch im Wildtyp nach Behandlung mit TM zutrifft. Die Hemmung der Proteinsynthese durch Cycloheximid führte zu einem Rückgang sowohl an Caspase-positiven Zellen (von 50% auf 30%) als auch von ROS-Akkumulation (von 68% auf 39%) und PI-positiven Zellen (von 49% auf 34%) (Abb. II.12A). Im



**Abbildung II.12:** Reduktion von Caspaseaktivität (linke Spalte), ROS-Akkumulation (mittlere Spalte) und PI-positiven Zellen (rechte Spalte) durch Zugabe des Proteinbiosynthesehemmstoffs Cycloheximid (50 µg/ml) (A), des Antioxidationsmittels NAC (10 mM) (B) und des Breitspektrum-Caspasehemmstoffs zVAD-FMK (20 µM) (C).

Die Wildtyp-Kulturen wurden bei 25 °C angezogen und anschließend für 8 h bei 37 °C mit 10 µg/ml Tunicamycin inkubiert. Die angegebenen Additiva wurden zum Zeitpunkt des „Temperaturshifts“ zugesetzt. zVAD-FMK, das 30 min vor dem Ernten ein weiteres Mal zugegeben wurde, erreichte danach eine Endkonzentration von 20 µM (Schwarze Graphen ohne Additiva, graue Graphen mit Additiva).

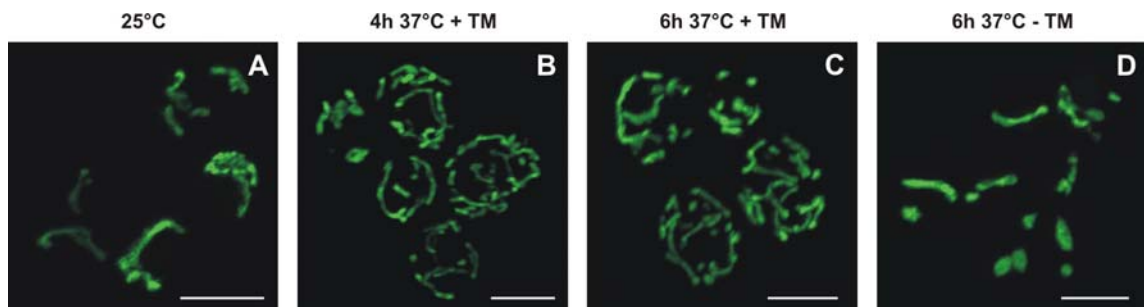
Gegensatz zu *wbp1-1*, wo die Hemmung der Proteinneusynthese nahezu eine vollkommene Reduktion der analysierten Phänotypen zur Folge hatte, konnte im Wildtyp die Anzahl an gefärbten Zellen nicht einmal halbiert werden. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Inhibition der N-Glykosylierung durch Tunicamycin weitaus schneller und effektiver abläuft als in der *wbp1-1* Mutante. Dadurch kommt es im ER schneller zur Akkumulation falsch gefalteter Proteine und einem damit einhergehenden früher eintretenden ER-Stress. Möglicherweise kann die Zelle trotz Zugabe von Cycloheximid noch auf den



Stress, ausgelöst durch TM und Temperaturerhöhung, reagieren und neue Proteine synthetisieren, die für die Induktion des PCD benötigt werden. Dies würde den starken Anstieg gefärbter Zellen, verglichen mit *wbp1-1* erklären. Durch Zugabe von NAC wurden Caspaseaktivität (von 50% auf 27%), ROS-Akkumulation (von 68% auf 50%) und PI-Färbung (von 49% auf 28%) jeweils reduziert (Abb. II.12B). Ebenso wurde die Caspaseaktivität von 57% auf 33% (Abb. II.12C) durch Zugabe des Breitspektrum Caspasehemmstoffs zVAD-FMK gehemmt.

### II.1.2.3 Veränderung der Mitochondrienmorphologie nach Behandlung der Zellen mit Tunicamycin

Da sich nach Induktion des N-Glykosylierungsdefekts in der *wbp1-1* Mutante durch einen „Temperaturshift“ auf die restriktive Temperatur die Morphologie der Mitochondrien durch deren Fragmentierung gravierend veränderte, sollte in einem weiteren Experiment untersucht werden, ob ähnliches auch im Wildtyp durch Tunicamycin bewirkt wird. Wie die Abbildung II.13A zeigt, erscheinen die Mitochondrien im Wildtypstamm, inkubiert bei 25 °C, als tubuläre Struktur, wobei meist ein Tubus pro Zelle vorhanden ist. Nach Induktion des Glykosylierungsdefekts durch Tunicamycin bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C wurden eine starke Anhäufung der Mitochondrien und eine Ausweitung des mitochondriellen Netzwerks festgestellt (Abb. II.13B). Diese Morphologie veränderte sich auch nicht wesentlich durch Verlängerung der Inkubationszeit von 4 auf 6 h (Abb. II.13B und C). Auch nach 8 h zeigte sich keine Veränderung des Phänotyps, wobei jedoch



**Abbildung II.13:** Analyse der Mitochondrienmorphologie im Wildtyp BY4741 nach Behandlung der Zellen mit 10 µg/ml Tunicamycin bei einer Inkubationstemperatur von 37°C. Die Balken entsprechen 5 µm.

zu bemerken ist, dass in etwa 25% - 40% der Zellen keine Mitochondrien mehr visualisiert werden konnten (Ergebnis nicht gezeigt). Dies dürfte mit dem Absterben der Zellen zusammenhängen (Abb. II.11, ca. 50% der Zellen waren PI-positive). Es konnte ausgeschlossen werden, dass dieser beobachtete Phänotyp alleine auf den Temperaturstress zurückzuführen war, da eine Inkubation der Kulturen bei 37 °C ohne Tunicamycin keine Veränderung in der Mitochondrienmorphologie nach sich zog (Abb. II.13D). Es fiel auf, dass das Erscheinungsbild der Mitochondrien im Wildtyp nach 4 h Inkubation bei 37 °C mit Tunicamycin und in der *wbp1-1* Mutante, inkubiert bei 25 °C, sehr ähnlich

war. Nicht nur im Wildtyp, sondern auch in der Mutante ist ein Defekt in der N-Glykosylierung vorhanden, wie durch das Unterglykosylierungsmuster der CPY ersichtlich ist (Abb. II.10B). Dieser Stress und der dadurch erhöhte Energiebedarf in der Zelle führen möglicherweise zu einer vermehrten Mitochondrienproduktion, was die starke Zunahme der tubulären Mitochondrienstrukturen erklären würde. Des Weiteren zeigte der Wildtypstamm keine Fragmentierung der Mitochondrien, wie es für die *wbp1-1* Mutante beobachtet wurde (Abb. II.13B und C im Vergleich zu Abb. II.5B-D). Dies deutet darauf hin, dass im Wildtyp durch die rasch einsetzende, vollständige Hemmung der N-Glykosylierung (in der Mutante kommt es zu einer langsamen Zunahme des Stresses) der programmierte Zelltod weniger von der Mitochondrienfragmentierung abhängig ist und somit etwas anders verläuft, als es für *wbp1-1* dokumentiert wurde.

## II.2 Welche Gene spielen in der Signalkaskade des programmierten Zelltods ausgelöst durch defekte N-Glykosylierung eine Rolle?

### II.2.1 Identifizierung von Proteinen, die den Wachstumsphänotyp in *wbp1-1* unterdrücken, mit Hilfe eines „Multi-copy Suppressor Screens“

Da bis jetzt erst wenige Proteine identifiziert werden konnten, die in die Signalkaskade des PCD in *S. cerevisiae* involviert sind, sollte in einem so genannten „Multi-copy Suppressor Screen“ versucht werden, anti-apoptotisch wirkende Proteine zu identifizieren. Hierfür wurde sich der Wachstumsphänotyp von *wbp1-1* bei 31 °C zu Nutze gemacht. Dieser Ansatz schien viel versprechend zu sein, da dieser Phänotyp durch heterologe Expression des humanen anti-apoptotischen Faktors *Bcl-2* unterdrückt werden konnte.

#### II.2.1.1 Auswertung des „Multi-copy Suppressor Screens“

Um positive Klone im „Screen“ zu identifizieren wurde die *wbp1-1* Mutante mit einer „high-copy“ Plasmidgenbank transformiert und bis zu 10 Tage bei 31 °C auf Agarplatten mit Minimalmedium inkubiert. Aus ca. 120.000 Hefeklonen konnten 110 Klone isoliert werden, die positives Wachstum bei 31 °C zeigten. Davon wurden 97 zur Identifikation der auf dem Plasmid enthaltenen Gene sequenziert. Die verbliebenen 13 Klone konnten vorher durch verschiedene Restriktionsverdaue ihrer Plasmide als doppelt isolierte Klone verifiziert werden und wurden somit von der Sequenzierung ausgeschlossen.

Die in Tabelle II.5 aufgelisteten Gene wurden in dem durchgeführten „Multi-copy Suppressor Screen“ mehrfach detektiert. Neben *WP1*, das 5x identifiziert worden war und wie erwartet die Punktmutation in der *wbp1-1* Mutante komplementiert, konnte ein weiteres für eine Untereinheit ( $\delta$ -Untereinheit) der Oligosaccharyltransferase kodierendes Gen, *SWP1*, 6x nachgewiesen werden. Durch Analysen von N-Glykosylierungsdefekten am Modellprotein Carboxypeptidase Y konnte von te Heesen und Mitarbeitern durch Überexpression von *SWP1* in der *wbp1-2* Mutante, die über einen geringeren Defekt als *wbp1-1* verfügt, das mature N-Glykosylierungsmuster der CPY nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu wurde der Defekt in *wbp1-1* durch die vermehrte Kopienzahl von Swp1p nur in einem geringen Maße verbessert (te Heesen *et al.*, 1993). Dies genügt offensichtlich, um den Wachstumsphänotyp von *wbp1-1* bei 31 °C zu unterdrücken, wie aus der Auswertung des „Multi-copy Suppressor Screens“ hervorgeht.

Zwei weitere Gene, durch deren vermehrte Expression Wachstum bei 31 °C ermöglicht wurde, konnten in dem „Screen“ identifiziert werden. Auf der einen Seite war dies *RSC30*, das die Transkription von Genen beeinflusst, die für die Instandhaltung der Zellwandintegrität benötigt werden (Angus-Hill *et al.*, 2001), auf der anderen Seite *KNH1*, das in die Synthese der Zellwandkomponente  $\beta$ -1,6-Glukan involviert ist. Die Überexpression beider Gene hat wahrscheinlich einen stabilisierenden Effekt auf die Zellwand und ermöglicht der *wbp1-1* Mutante dadurch besseres Wachstum bei 31 °C. Des Weiteren wurden vier Gene identifiziert, deren erhöhte Expression den durch den N-Glykosylierungsdefekt verursachten Zellstress reduzierten. Diese spielen eine Rolle bei der Instandhaltung des mitochondriellen Genoms (*SEDI*), der Stabilisierung von mRNA (*PAP1*), der Phosphatidsäuresynthese und somit der Stabilisierung von Membranen (*SLC1*) und beim Vesikeltransport zwischen ER und Golgi-Apparat (*YIP3*). Das jedoch am häufigsten im „Multi-copy Suppressor Screen“ identifizierte Gen, *OST2*, das 10x nachgewiesen werden konnte, wurde aufgrund dieser Tatsache im folgenden Abschnitt detaillierter untersucht.

GEN	Anzahl	Funktion des Genprodukts
<i>OST2</i>	10x	$\varepsilon$ -Untereinheit des Oligosaccharyltransferasekomplexes
<i>SWP1</i>	6x	$\delta$ -Untereinheit des Oligosaccharyltransferasekomplexes
<i>WBP1</i>	5x	$\beta$ -Untereinheit des Oligosaccharyltransferasekomplexes
<i>PAP1</i>	4x	Poly(A) Polymerase. Einer von drei Faktoren, die für mRNA 3'-Polyadenylierung benötigt werden
<i>SEDI</i>	4x	Bedeutendes, stressinduziertes, strukturelles GPI-Zellwandprotein in Zellen, die sich in der stationären Phase befinden; spielt eine mögliche Rolle bei der Instandhaltung des mitochondriellen Genoms
<i>KNH1</i>	3x	Protein mit Ähnlichkeit zu Kre9p, das bei der Zellwand $\beta$ -1,6-Glukan Synthese beteiligt ist; Überexpression unterdrückt den Wachstumsdefekt der kre9 Nullmutante
<i>SLC1</i>	3x	1-Acyl-sn-Glycerol-3-Phosphat Acyltransferase; wird für die Bildung von Phosphatidsäure, einem wichtigen Zwischenprodukt im Fettstoffwechsel, benötigt; kommt unter anderem im ER vor
<i>RSC30</i>	2x	Bestandteil des “Remodel the Structure of Chromatin” (RSC) Komplexes; nicht essentielles Gen, das für die Regulation bei Zellwandstress benötigt wird
<i>YIP3</i>	2x	Protein ist in COPII-Vesikeln lokalisiert; ist wahrscheinlich am Vesikeltransport von ER zum Golgi Apparat beteiligt

**Tabelle II.5: Auflistung der Gene, die im „Multi-copy Suppressor Screen“ mehrfach identifiziert wurden.**



mature Form der CPY auftrat (Abb. II.14A, 3. und 6. Spur von links). Es ist zwar unwahrscheinlich, dass diese äußerst geringe Reduktion des N-Glykosylierungsdefekts ein besseres Wachstumsverhalten von *wbp1-1* bei 31 °C zur Folge hatte, konnte jedoch anhand dieses Versuches nicht ausgeschlossen werden.

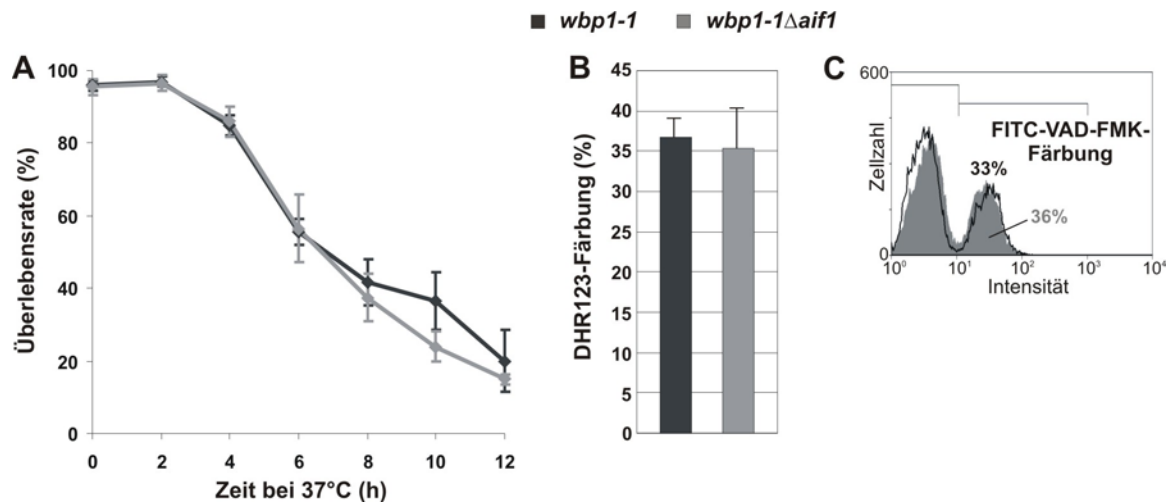
Die Aminosäuresequenz von Ost2p weist eine 40%ige Übereinstimmung mit der von Dad1p („defender against apoptotic death“) auf, das in Säugerzellen als negativer Regulator der apoptotischen Signalkaskade identifiziert werden konnte (Nakashima *et al.*, 1993). In einer durch Punktmutation hergestellten temperatursensitiven *ost2* Mutante konnte bei restriktiver Temperatur PCD mit typischen apoptotischen Merkmalen wie Phosphatidylserintranslokation (Abb. I.5H, Sugiura und Takagi, 2006), Chromatinkondensation, DNA-Fragmentierung (Abb. I.5A und E) und Caspaseaktivität (diese Arbeit) nachgewiesen werden. Da das Gen ebenso mehrfach in dem durchgeführten „Multi-copy Suppressor Screen“ (II.2.1.1) identifiziert wurde, stellte Ost2p einen hoffnungsvollen Kandidaten für die Involvierung an der apoptotischen Signalkaskade dar. Deswegen wurden Caspaseaktivität (Abb. II.14B) und ROS-Akkumulation (Abb. II.14C) in *wbp1-1 pVT100* und *wbp1-1 pVT100-OST2* untersucht. Es konnten jedoch keine nennenswerten Veränderungen weder in der Caspaseaktivität (Abb. II.14B, 28% und 33%) noch in der Anzahl an ROS-positiven Zellen (Abb. II.14C, 18% und 15,5%) nachgewiesen werden. Da in dem Stamm *wbp1-1 pVT100-OST2* die Überexpression von *OST2* nicht nachgewiesen werden konnte, wurde in einem weiteren Experiment an das C-terminale Ende von *OST2* ein sog. ZZ-Epitop, bestehend aus zwei hintereinander geschalteten Protein A IgG Bindedomänen, fusioniert. Nach Überprüfung der Expression von Ost2p-ZZ mittels Western-Blot Analyse (Ergebnis nicht gezeigt) wurde auch in diesem Stamm (*wbp1-1 pVT100-OST2-ZZ*) Caspaseaktivität nach 6 h Inkubation bei 37 °C untersucht, wobei kein Unterschied zur Kontrolle (Abb. II.14B) festgestellt werden konnte (30% Caspase-positive Zellen, Ergebnis nicht gezeigt). Diese Resultate zeigen, dass Überexpression von Ost2p die Anzahl der für die analysierten apoptotischen Marker positiven Zellen nicht veränderte. Somit könnte die geringfügig verbesserte Glykosylierung in *wbp1-1 pVT100-OST2*, wie es nach 4 h Inkubation bei 37 °C für die CPY gezeigt werden konnte (Abb. II.14A), für das bessere Wachstumsverhalten und damit für die mehrfache Detektion im „Multi-copy Suppressor Screen“ verantwortlich sein.

## **II.2.2 Analyse von Hefegenen, die Homologie zu humanen pro-apoptotischen Genen aufweisen**

In den letzten Jahren konnten in *Saccharomyces cerevisiae* mehrere Proteine identifiziert werden, die an der Signalkaskade des programmierten Zelltods beteiligt sind und für die homologe Gene in Höheren Eukaryoten existieren. Neben der Metacaspase *YCA1* („Yeast Caspase-1“) (Madeo *et al.*, 2002), die aktuell das prominenteste Mitglied dieser Gruppe von Proteinen darstellt, wird auch *AIF1* („apoptosis inducing factor“) (Wissing *et al.*, 2004), *ND11* („NADH dehydrogenase internal“) (Li *et al.*, 2006b) und *NMA111* („nuclear mediator of apoptosis“) (Fahrenkrog *et al.*, 2004) eine mögliche wichtige Rolle in der apoptotischen Signalkaskade in Hefe beigemessen. Ein weiteres Protein, das sich durch Homologie zu einem in der verkürzten Form pro-apoptotisch wirkenden humanen Proteins auszeichnet, ist Yet2p. Die genannten Gene werden im folgenden Abschnitt auf ihre Beteiligung an der Signalkaskade im Zusammenhang mit defekter N-Glykosylierung untersucht (*YCA1* in Abschnitt II.3, um einen direkten Vergleich zur Kex1p Protease zu haben).

### **II.2.2.1 „Apoptosis Inducing Factor“ (*AIF1*)**

Der humane „apoptosis inducing factor“ (AIF) kodiert für ein Flavoprotein mit NADH Oxidaseaktivität. Am N-terminalen Ende besitzt das Protein eine mitochondrielle Lokalisationssequenz, mit der es in der inneren Mitochondrienmembran verankert ist. Nach Induktion von Apoptose wird der C-terminale Bereich des Proteins enzymatisch abgespalten und durch die neu entstandenen Kanäle in der äußeren Mitochondrienmembran („mitochondrial outer membrane permeabilization“ (MOMP)) ins Cytosol und anschließend in den Nukleus transportiert, wo es zu Chromatinkondensation und DNA-Degradation führt (Modjtahedi *et al.*, 2006; Susin *et al.*, 1999). Aif1p aus *S. cerevisiae* zeigt in der Aminosäuresequenz sehr starke Ähnlichkeit mit den humanen Homologen AIF und AMID („AIF-homologous mitochondrion-associates inducer of death“). AMID, das über keine nukleäre Lokalisationssequenz verfügt, konnte an der äußeren Mitochondrienmembran und im Cytosol nachgewiesen werden, wohingegen AIF (human) und *AIF1* (*S. cerevisiae*) durch Induktion bestimmter apoptotischer Stimuli vom Mitochondrium in den Zellkern transportiert wurden (Wissing *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2002). Disruption von *AIF1* in *S. cerevisiae* führte unter zellulären Stressbedingungen, zum Beispiel in alternden und mit Wasserstoffperoxid behandelten Kulturen, zu einer Verbesserung der Überlebensrate und einer Verminderung apoptotischer Marker, wobei Überexpression das Gegenteil bewirkte (Wissing *et al.*, 2004). Dagegen hatte die Deletion von *AIF1* nach Induktion des programmierten Zelltods durch Überexpression des humanen pro-apoptotischen Faktors Bax (Kissova *et al.*, 2006), hyperosmotischen Stress (Silva *et al.*, 2005) und in multizellulären Kolonien (Vachova und Palkova, 2005) keine reduzierende Wirkung auf die analysierten



**Abbildung II.15: Disruption von AIF1 verursacht in *wbp1-1* keine Veränderung der Überlebensrate (A), der ROS-Produktion (B) und der Caspaseaktivität (C).**

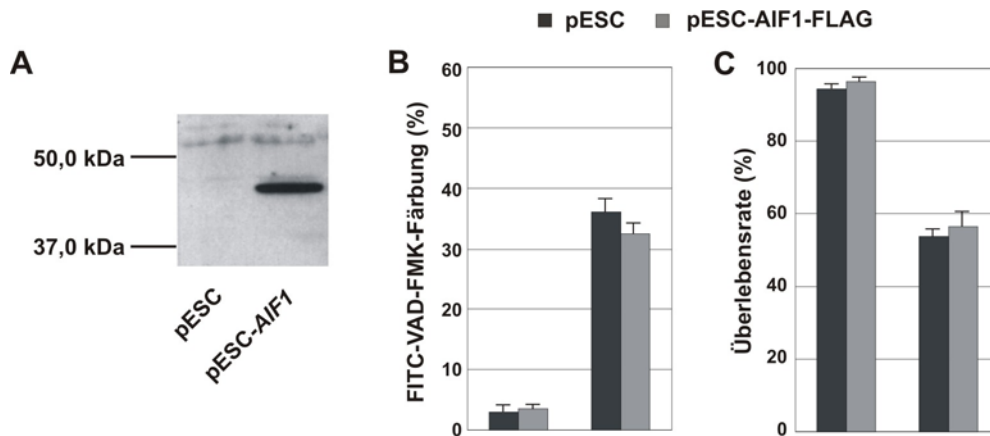
A: Überlebensrate von *wbp1-1* und *wbp1-1Δaif1* nach Umsetzen der Kulturen für 2 bis 12 h auf restriktive Temperatur.

B: Mikroskopische Quantifizierung der ROS-Produktion in *wbp1-1* und *wbp1-1Δaif1* nach 4 h bei 37 °C.

C: Caspaseaktivität in *wbp1-1* und *wbp1-1Δaif1* nach 4 h Inkubation bei 37 °C. Die Analyse erfolgte im Durchflußzytometer.

apoptotischen Merkmale. Auch nach Induktion des N-Glykosylierungsdefekts in *wbp1-1* konnte nach Disruption von AIF1 weder eine Zunahme der Überlebensrate (Abb. II.15A) noch eine Reduktion der untersuchten apoptotischen Merkmale, nämlich ROS-Produktion (Abb. II.15B) und Caspaseaktivität (Abb. II.15C), nachgewiesen werden. Wie oben angedeutet, konnte nicht nur für die Disruption von AIF1, sondern auch für dessen Expression ein Einfluss auf die apoptotische Signalkaskade beobachtet werden. Nach Behandlung von Kulturen mit 0,4 mM Wasserstoffperoxid wurde durch Expression von AIF1 eine Zunahme der Caspaseaktivität und der Absterberate festgestellt (Wissing *et al.*, 2004). Um die Auswirkungen einer vermehrten Kopienzahl von AIF1 in *wbp1-1* nachzuweisen, wurde in einem ersten Experiment mittels SDS-PAGE und Western-Blot Analyse untersucht, ob AIF1 von den Zellen tatsächlich exprimiert wurde (Abb. II.16A). Hierfür wurden die Zellen in Minimalmedium ohne Histidin (verwendeter Vektor pESC-His) für 24 h bei 25 °C inkubiert, wobei im Medium Galaktose als Kohlenstoffquelle verwendet wurde, da das Gen unter der Kontrolle eines durch Galaktose-induzierbaren Gal1 Promoters stand. Zum Nachweis in der Western-Blot Analyse wurde an das Konstrukt am C-terminalen Ende ein so genannten FLAG-Tag, eine acht Aminosäuren langen Peptidsequenz (N-DYKDDDDK-C), fusioniert. Die in Abbildung II.16A sichtbare starke Bande (rechte Spur) bei etwa 41 kDa, im Vergleich zur Vektorkontrolle (linke Spur), entspricht der erwarteten Größe von Aif1p-FLAG und bestätigt die Expression des Proteins. Trotz der Expression von Aif1p in einem „Multicopy“ Plasmid unter der Kontrolle des starken Gal-Promotors konnte keine Veränderung der Caspaseaktivität (Abb. II.16B) und der Überlebensrate (Abb. II.16C) nach Inkubation der Kulturen für 24 h bei restriktiver Temperatur gezeigt werden. Für die unter Abbildung



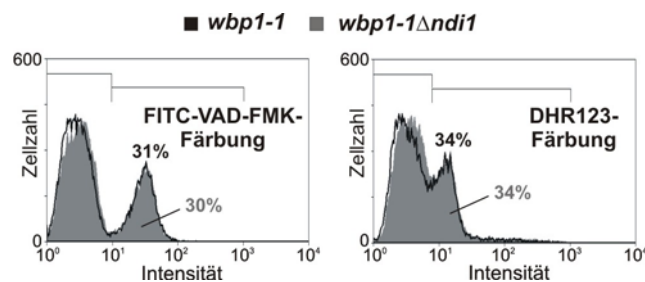


**Abbildung II.16: Expression von AIF1 in *wbp1-1* führt zu keiner Stimulation des programmierten Zelltods.** Die Zellen wurden in Minimalmedium ohne Histidin und mit Galaktose als Kohlenstoffquelle inkubiert. A: Expressionsnachweis von Aif1p-FLAG in *wbp1-1* mittels Western-Blot Analyse. Pro Spur wurde eine Proteinmenge des Überstands von 5 µg nach Glasperlenaufschluss auf einem 8%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Western-Blot Analyse untersucht. Caspaseaktivität (B) und Überlebensrate (C) in *wbp1-1* pESC und pESC-AIF1-FLAG nach 24 h bei 37 °C.

II.16 aufgeführten Experimente war ein längerer „Temperaturshift“ auf 37 °C notwendig, da die Inkubation der Zellen in Minimalmedium mit Galaktose als Kohlenstoffquelle zu einem stark verlangsamten Wachstum der Kulturen führte.

### II.2.2.2 „NADH Dehydrogenase Internal“ (*NDI1*)

Wie unter II.2.2.1 beschrieben, zeigt Aif1p Sequenzhomologie zu den humanen AIF und AMID. AMID ist ebenso wie AIF ein Flavoprotein mit NADH-abhängiger Oxidoreduktaseaktivität und zudem in der Lage *in vivo* unspezifisch an DNA zu binden (Marshall *et al.*, 2005). Wu *et al.* konnten außerdem zeigen, dass Überexpression von AMID in humanen embryonalen Nierenzellen zu Caspase-unabhängiger Apoptose führt (Wu *et al.*, 2002). Vor kurzem wurde in *S. cerevisiae* neben AIF1 ein weiteres Homologes zu AIF und AMID identifiziert. Dieses Homologe, *NDI1*, kodiert für eine NADH Ubiquinon Oxidoreduktase, die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist und am Transfer der Elektronen von NADH auf Ubiquinon in der Atmungskette beteiligt ist. Disruption dieses Gens

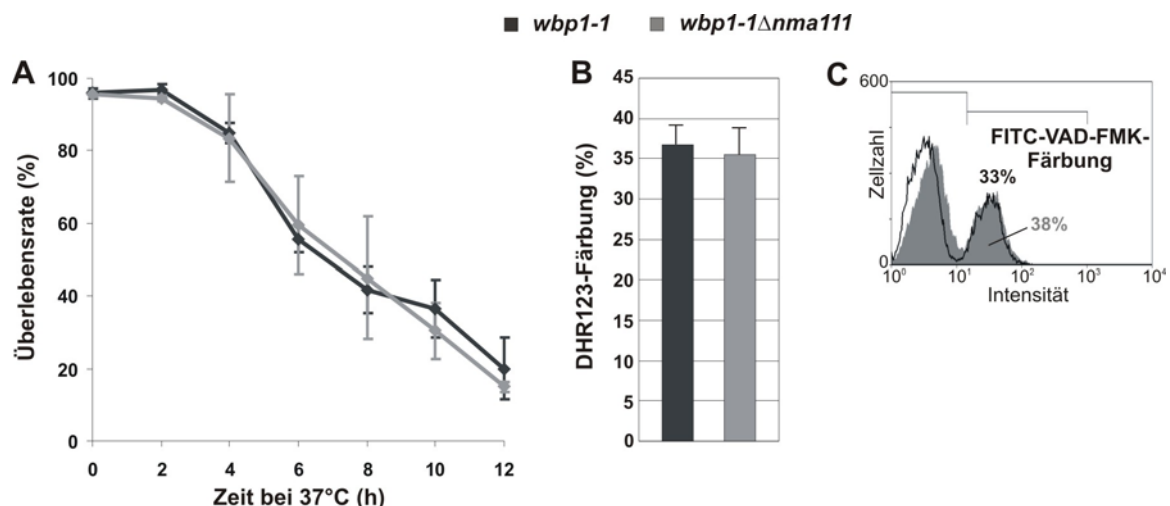


**Abbildung II.17: Disruption von *NDI1* in *wbp1-1* hat keine Auswirkungen auf Caspaseaktivität (links) und ROS-Akkumulation (rechts).**

führte zu einer verbesserten Überlebensrate und durch Überexpression konnten verschiedene apoptotische Phänotypen, unter anderem eine vermehrte ROS-Produktion, die möglicherweise eine sehr wichtige Rolle in der durch Ndi1p ausgelösten apoptotischen Signalkaskade spielt, nachgewiesen werden (Li *et al.*, 2006b). In der durchgeführten Transkriptomanalyse (siehe V.4.9) wurde ein mehr als 5facher Expressionsanstieg von *NDII* in *wbp1-1* bei 37  C im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen. Um auszuschließen, dass Ndi1p mitverantwortlich ist für die nachgewiesene ROS-Akkumulation in *wbp1-1*, wurde *NDII* in der N-Glykosylierungsmutante disruptiert. Dies bewirkte weder eine Abnahme der Caspaseaktivität (Abb. II.17, links) noch eine Reduktion der ROS-Produktion (Abb. II.17, rechts), was darauf hindeutet, dass der Oxidoreduktaseaktivit t von Ndi1p in der vorliegenden Signalkaskade keine besondere Bedeutung beigemessen werden kann.

### II.2.2.3 „Nuclear Mediator of Apoptosis“ (*NMA111*)

Ein weiteres mögliches Schlüsselprotein in der apoptotischen Signalkaskade in *S. cerevisiae* ist das HtrA2/Omi-ähnliche Protein Nma111 („nuclear mediator of apoptosis“), das zur Familie der HtrA-ähnlichen Serinproteasen gehört und wie sein Homologes im Menschen (HtrA2/Omi) pro-apoptotische Aktivität besitzt. Im Gegensatz zum HtrA2/Omi, das in Mitochondrien lokalisiert ist, wurde Nma111p in *S. cerevisiae* nur im Nukleus nachgewiesen, wo es nach Induktion von Stressstimuli Aggregate bildet (Fahrenkrog *et al.*, 2004). Disruption von *NMA111* förderte das  berleben der Zellen nach Temperaturstress und verhinderte das Auftreten apoptotischer Marker, wie Chromatinkondensation, DNA-Fragmentierung und ROS-Akkumulation nach Behandlung der Zellen



**Abbildung II.18: Disruption von *NMA111* in *wbp1-1* verursacht keine Veränderung der Absterberate (A), ROS-Akkumulation (B) und Caspaseaktivität (C).**

A: Überlebensrate in *wbp1-1* und *wbp1-1Δnma111* nach 2 bis 12 h Inkubation bei 37  C.

B: Auswertung der ROS-Produktion in *wbp1-1* und *wbp1-1Δnma111* nach 4 h bei 37  C mittels konfokaler Mikroskopie.

C: Durchflußzytometrische Analyse der Caspaseaktivität in *wbp1-1* und *wbp1-1Δnma111* nach 4 h Inkubation bei restriktiver Temperatur.

mit Wasserstoffperoxid. Umgekehrt führte Überexpression zum Absterben der Zellen und verstärkte die genannten apoptotischen Phänotypen (Fahrenkrog *et al.*, 2004). Wie in Abbildung II.18 gezeigt, scheint *NMA111* nicht in die apoptotische Signalkaskade, induziert durch defekte N-Glykosylierung, involviert zu sein. Es konnte weder eine Verbesserung der Überlebensrate (Abb. II.18A), noch eine Reduktion reaktiver Sauerstoffspezies (Abb. II.18B) oder Caspaseaktivität (Abb. II.18C) detektiert werden. Möglicherweise nimmt dieses Protein eine sehr spezielle Funktion in der molekularen Maschinerie der Hefeapoptose ein, da bis heute keine weitere Verbindung zu Apoptose auslösenden Agenzien oder Mutationen hergestellt werden konnte.

#### II.2.2.4 „Yeast Endoplasmic reticulum Transmembrane protein“ (*YET2*)

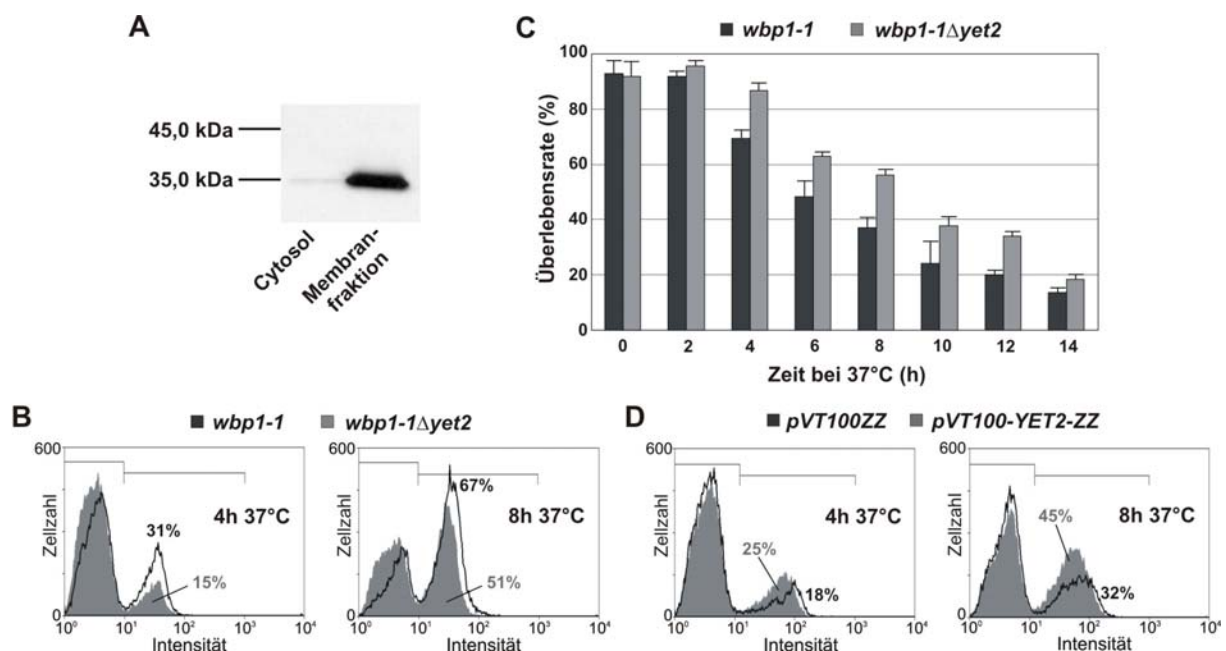
BAP31 kodiert in Säugern für ein Transmembranprotein des Endoplasmatischen Retikulums, dessen C-terminales Ende ins Cytosol ragt (Ng *et al.*, 1997). Das während der Evolution stark konservierte Protein ist am intrazellulären Vesikeltransport vom ER zum Golgi-Apparat beteiligt (Paquet *et al.*, 2004) und scheint bei der Qualitätskontrolle von Proteinen im ER eine Rolle zu spielen (Lambert *et al.*, 2001). Es ist ebenso in die durch ER-Stress ausgelöste apoptotische Signalkaskade involviert, da

Gen	Funktion des Genprodukts	wbp1-1 37 °C → WT 37 °C		wbp1-1 37 °C → wbp1-1 25 °C	
			Veränderung		Veränderung
<i>YET1</i>	Homolog zu BAP31 aus Säuger	1,9	I	1,2	I
<i>YET2</i>	Homolog zu BAP31 aus Säuger	9,2	I	7	I
<i>YET3</i>	Homolog zu BAP31 aus Säuger	1,9	I	1,3	I

**Tabelle II.6: Auswertung der Transkriptomanalyse für die BAP31 Homologen *YET1*, *YET2* und *YET3*. Increase (I).**

es mit der Procaspase-8, einer von drei Effektorcaspasen, und mit Mitgliedern der *Bcl-2* Familie (*Bcl-2*, *Bcl-x<sub>L</sub>*) einen Komplex bilden kann (Breckenridge *et al.*, 2003a; Ng *et al.*, 1997). BAP31 wirkt in seiner Vollformenform anti-apoptotisch, besitzt jedoch zwei Proteinsequenzen, an denen Caspasen schneiden können. Das nach Spaltung entstandene verkürzte Protein, genannt p20, verursacht Ca<sup>2+</sup>-Ausstrom aus dem ER und eine damit verbundene mitochondrielle Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme, was schließlich zur Spaltung der äußeren Mitochondrienmembran führt. Außerdem aktiviert p20 ein an

Mitochondrien lokalisiertes Dynamin, Drp1, das für die Fragmentierung der äußeren Mitochondrienmembran mit verantwortlich ist (Breckenridge *et al.*, 2003b) und mittels eines Sortierproteins proapoptotisches Bid an eben diese dirigiert (Simmen *et al.*, 2005). Diese Fragmentierung der äußeren mitochondrialen Membran führt letztendlich zur Induktion der apoptotischen Signalkaskade durch Freisetzung von pro-apoptotischen Substanzen aus dem mitochondrialen Intermembranbereich ins Cytosol. Von BAP31 konnten mehrere Homologe in verschiedenen Organismen identifiziert werden, unter anderem drei in *S. cerevisiae*, *YET1*, *YET2* und *YET3* („yeast endoplasmic reticulum transmembrane protein“), wobei bis jetzt über die Funktion der ORFs noch wenig bekannt ist. Die Auswertung der Transkriptomanalyse ergab, dass in *wbp1-1* nach einem „Temperaturshift“ von 4 h auf 37 °C und den dadurch auftretenden ER-Stress die Expression von *YET2*, nicht aber von *YET1* und



**Abbildung II.19: Auswirkungen der Disruption und Expression von YET2 in *wbp1-1* auf Caspaseaktivität und Überlebensrate.**

**A:** Lokalisationsanalyse von YET2 nach Markierung mit einem ZZ-Epitop. Pro Spur wurden 0,5 OD Zellen von Cytosol und Membranfraktion auf einem 8%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Western-Blot Analyse untersucht.

**B:** Durchflußzytometrische Analyse der Caspaseaktivität in *wbp1-1* und *wbp1-1Δyet2* nach 4 h und 8 h bei restriktiver Temperatur. Die Kulturen wurden in YPD inkubiert.

**C:** Überlebensrate von *wbp1-1* und *wbp1-1Δyet2* nach „Temperaturshift“ der Kulturen für 2 bis 14 h auf 37 °C.

**D:** Analyse der Caspaseaktivität mittels Durchflußzytometrie nach Expression von YET2 in *pVT100-ZZ* für 4 h und 8 h bei 37 °C. Die Kultivierung der Zellen wurde in Minimalmedium durchgeführt.

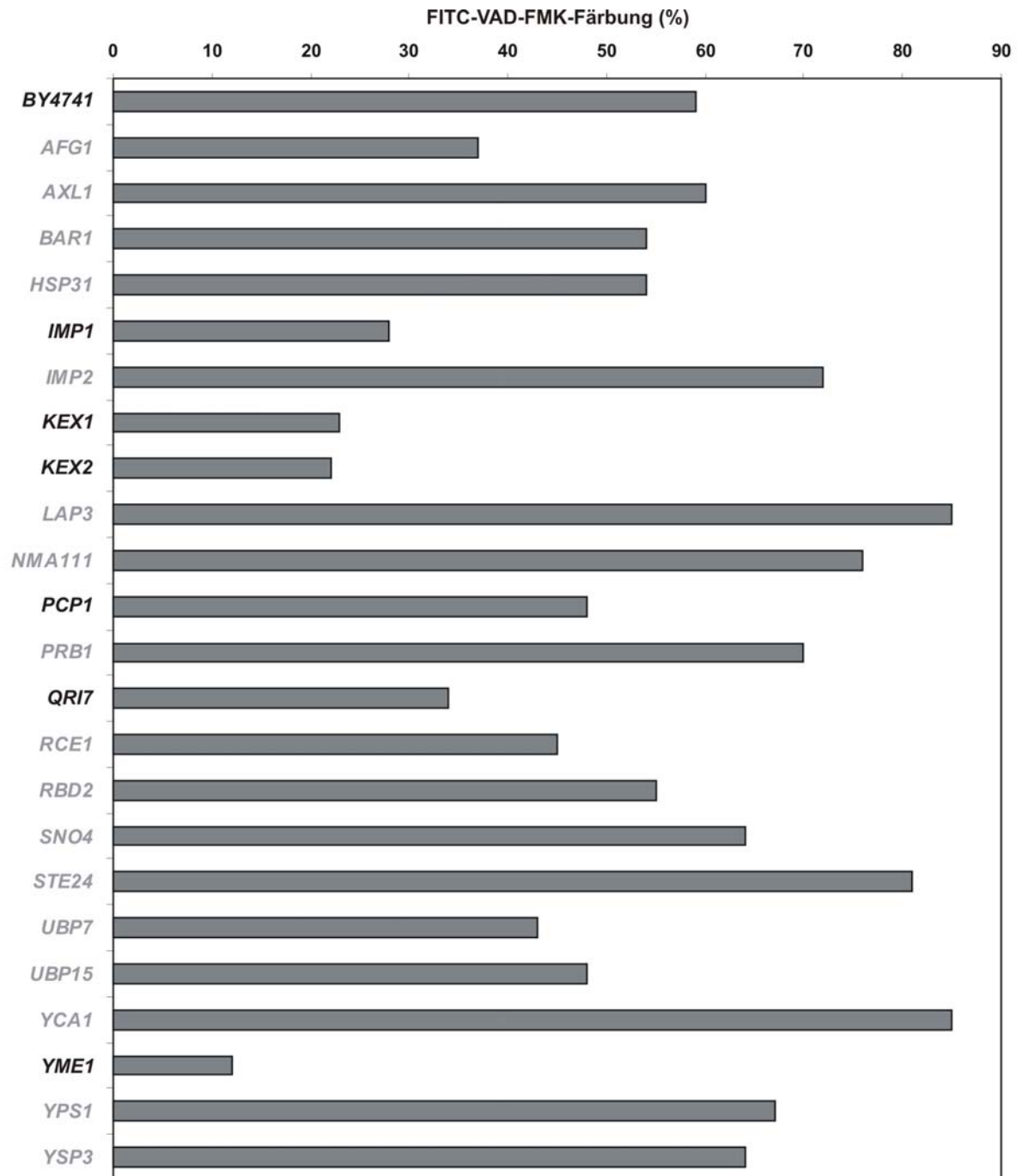
*YET3*, im Vergleich zum gleichbehandelten Wildtyp oder der bei 25 °C inkubierten Mutante stark hochreguliert wurde (Tab. II.6, rot hinterlegt). Aufgrund dieser starken Hochregulation nach Induktion von ER-Stress schien Yet2p ein viel versprechender Kandidat zu sein, der sowohl als Chaperon am so genannten „unfolded protein response“ (UPR), wie das humane BAP31 (Lambert *et al.*, 2001), als auch an der apoptotischen Signalkaskade beteiligt sein könnte. Um dies weiter zu analysieren wurden

in einem ersten Experiment Caspaseaktivität und Überlebensrate in *wbp1-1Δyet2* im Vergleich zu *wbp1-1* analysiert. Abbildung II.19B zeigt, dass die Disruption von Yet2p eine Reduktion der Caspaseaktivität von 31% auf 15% nach 4h Inkubation bei 37 °C und von 67% auf 51% nach 8 h Inkubation bei 37 °C nach sich zog (Abb. II.19B). Ebenso wurde ein Anstieg der Überlebensrate nach Umsetzen der Kulturen für 2 bis 14 h auf 37 °C ermittelt (Abb. II.19C). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde des Weiteren Caspaseaktivität in einer Yet2p exprimierenden Kultur analysiert. Die Expression des wie in einem Hydropathie-Blot vorhergesagten in der Membran verankerten Yet2 Proteins (Abb. II.19A) hatte eine Zunahme an Zellen mit Caspaseaktivität zur Folge. Nach 4 h bei 37 °C wurde eine geringe Steigerung der Caspaseaktivität von 18% auf 25% und nach 8 h von 32% auf 45% detektiert (Abb. II.19D). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Yet2p möglicherweise in die Signalkaskade des PCD als pro-apoptotisches Protein involviert ist. Da die Veränderungen in Caspaseaktivität und Überlebensrate jedoch relativ gering waren, wurde in dieser Arbeit auf eine intensivere Analyse des Proteins verzichtet.

## **II.2.3 Welche Proteasen sind in die Signalkaskade des programmierten Zelltods involviert?**

### **II.2.3.1 Identifikation von Proteasen durch einen Screen der Deletionsgenbankstämme nach Behandlung mit Tunicamycin**

Caspasen spielen wie einleitend erläutert eine zentrale Rolle in der apoptotischen Signalkaskade. Vor kurzem wurde in *S. cerevisiae* ein Mitglied der Metacaspase- und Paracaspasefamilie identifiziert, das gewisse Homologie zu Säugercaspasen sowohl in der Primär- als auch in der Sekundärstruktur aufwies (Uren *et al.*, 2000). Die Beteiligung dieser Caspase-ähnlichen Protease, genannt *YCA1* („yeast caspase-1“)/*MCA1* („metacaspase-1“), am programmierten Zelltod konnte durch mehrere Apoptose auslösende Stimuli nachgewiesen werden (Herker *et al.*, 2004; Madeo *et al.*, 2002; Mitsui *et al.*, 2005; Reiter *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2005). Daneben wurde aber auch ein *YCA1*-unabhängiger programmierter Zelltod detektiert (Fannjiang *et al.*, 2004; Herker *et al.*, 2004; Vachova und Palkova, 2005). Da *YCA1*, wie nachfolgend dargestellt, nicht am programmierten Zelltod, ausgelöst durch eine defekte N-Glykosylierung, beteiligt ist, wurden sämtliche Stämme der Euroscarf Deletionsgenbank, deren deletierter ORF („open reading frame“) für Proteasen kodierte, verwendet, um proteolytische Aktivitäten zu identifizieren, die an der Ausführung des programmierten Zelltods im vorliegenden Fall beteiligt sind. Hierfür wurden die Kulturen bei 25 °C auf eine OD<sub>600</sub> zwischen 0,1 und 0,5 angezogen und für 8 h bei 37 °C mit dem N-Glykosylierungshemmstoff Tunicamycin inkubiert. Der relativ hohe Unterschied in der OD<sub>600</sub> der Kulturen zum Zeitpunkt der Tunicamycingabe und des Umsetzens auf die restriktive Temperatur, der eine Veränderung der Caspaseaktivität nach sich ziehen kann (siehe II.1.1.8), resultierte aus der nicht bekannten Verdopplungszeit der disruptierten Stämme. In Tabelle II.7 ist die Caspaseaktivität einiger der 95 untersuchten in unterschiedlichen Proteasen defizienten Stämmen gezeigt. Im Wildtyp BY4741 zeigten 58% der untersuchten Zellen Caspaseaktivität. In sechs der 95 Stämme konnte eine mehr oder weniger stark reduzierte Caspaseaktivität im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden:  $\Delta imp1$  (28%),  $\Delta kex1$  (23%),  $\Delta kex2$  (22%),  $\Delta pcp1$  (48%),  $\Delta qri7$  (34%) und  $\Delta yme1$  (12%). Diese Gene wurden anschließend in *wbp1-1* disruptiert und die Stämme auf weitere Phänotypen des PCD untersucht. Für *wbp1-1 $\Delta imp1$*  und *wbp1-1 $\Delta yme1$*  konnte keine Reduktion an Caspaseaktivität und ROS-Produktion nach dem Umsetzen der Kulturen auf die restriktive Temperatur von 37 °C nachgewiesen werden, für *wbp1-1 $\Delta pcp1$*  nur eine sehr geringe, weshalb das Hauptaugenmerk auf die drei verbleibenden Stämme,  $\Delta kex1$ ,  $\Delta kex2$  (siehe II.3) und  $\Delta qri7$  (siehe II.2.3.2) gerichtet wurde. Zwei weitere ORFs, die eine viel versprechende Reduktion der Caspaseaktivität aufwiesen, konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr analysiert werden (*YBR284W*, *YCR045C*).

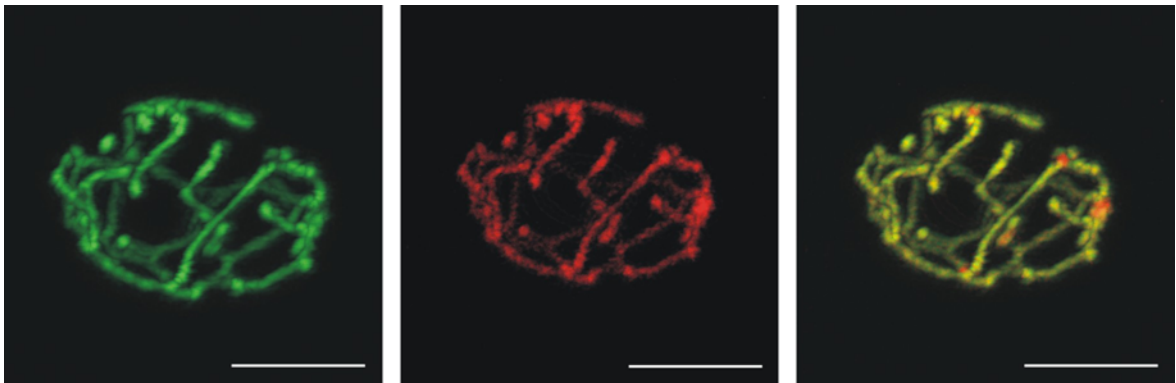


**Tabelle II.7: Analyse der Caspaseaktivität in BY4741 (Wildtyp) und in Protease defizienten Stämmen aus der Euroscarf Deletionsgenbank.**

Die Stämme wurden auf eine  $OD_{600}$  zwischen 0,1 und 0,5 angezogen und für 8 h bei 37 °C mit 10 µg/ml Tunicamycin inkubiert. Anschließend wurde die Caspaseaktivität durchflußzytometrisch detektiert. Schwarz markierte Gene (links) wurden für weitere Analysen verwendet.

### II.2.3.2 Disruption und Überexpression von *QRI7/YDL104C* beeinflussen den programmierten Zelltod in *wbp1-1*

Da der *QRI7*-Deletionsstamm eine stark verminderte Caspaseaktivität in dem unter II.2.3.1 beschriebenen Experiment an den Tag gelegt hatte und außerdem nahezu uncharakterisiert war, schien er ein guter Kandidat für weitere Untersuchungen zu sein. Um die vorhergesagte mitochondrielle Lokalisation zu überprüfen (Reinders *et al.*, 2006) wurden zwei Plasmide, pVT100-mt-GFP (ura-Marker) und YEplac-*QRI7*-RFP (leu-Marker), in den Wildtypstamm BY4742 transformiert. Der erste Expressionsvektor wurde verwendet, um die Mitochondrien zu visualisieren (siehe auch II.1.1.3). In das zweite Plasmid, YEplac, bei dem es sich ebenfalls um ein Expressionsplasmid handelt, wurde *QRI7* vor RFP („red fluorescent protein“) kloniert, um die Lokalisation von Qri7p mit einem anderen Laser überprüfen zu können. Das mt-GFP konnte im tubulären mitochondriellen Netzwerk lokalisiert werden (Abb. II.20, links). Für *QRI7*-RFP (Abb. II.20, Mitte) wurde eine nahezu perfekte Co-



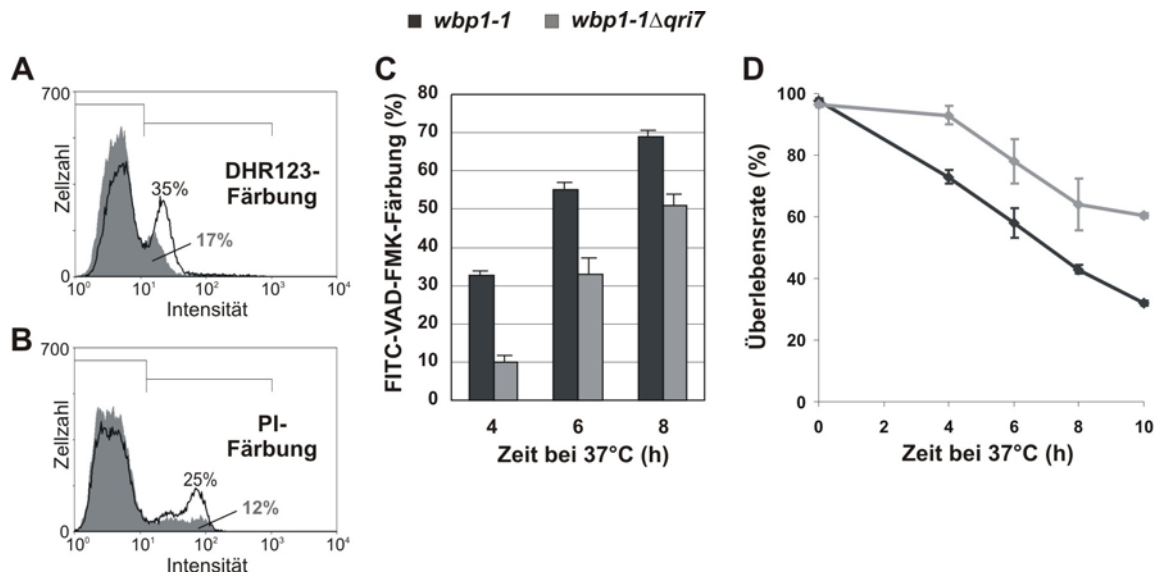
**Abbildung II.20: Analyse der Lokalisation von Qri7p.**

In den Wildtypstamm BY4742 wurden die Plasmide pVT100-mt-GFP (Anregung bei 488 nm, grüner Kanal, linke Abbildung) und YEplac-*QRI7*-RFP (Anregung bei 543 nm, roter Kanal, mittlere Aufnahme) kloniert. Die Kultur wurde in Minimalmedium ohne Leucin und Uracil auf eine  $OD_{600}$  von 2 angezogen und am konfokalen Mikroskop analysiert. Die rechte Abbildung zeigt die Überlagerung der beiden Kanäle. Die Balken entsprechen 5  $\mu$ m.

Lokalisation mit mt-GFP nachgewiesen (Abb. II.20, rechts). Somit konnte die mitochondrielle Lokalisierung von Qri7p, wie von Reinders mittels biochemischer Methoden vorhergesagt, zellbiologisch bestätigt werden (Reinders *et al.*, 2006).

Wie unter II.2.3.1 gezeigt führte die Deletion von *QRI7* im Wildtyp BY4741 durch Inkubation der Kultur mit Tunicamycin bei 37 °C zu einer starken Reduktion der Caspaseaktivität. Deshalb wurde untersucht, ob Disruption von *QRI7* in *wbp1-1* auch eine Verminderung der in dieser Mutante identifizierten apoptotischen Phänotypen zur Folge hatte. Im Vergleich zu *wbp1-1* konnte in *wbp1-1Δqri7* eine reduzierte ROS-Akkumulation der Zellen von 35% auf 17% nach einem „Temperaturshift“ von 4 h auf die restriktive Temperatur detektiert werden (Abb. II.21A), sowie ein Rückgang an PI-positiven Zellen von 25% auf 12% (Abb. II.21B). In einem weiteren Experiment, in





**Abbildung II.21: Disruption von *QRI7* in *wbp1-1* vermindert ROS-Akkumulation (A), PI-Färbung (B) und Caspaseaktivität (C) und verbessert die Überlebensrate (D).**

Die Kulturen wurden für 4 h auf 37 °C umgesetzt und anschließend mit DHR123 (A) und PI (B) gefärbt.

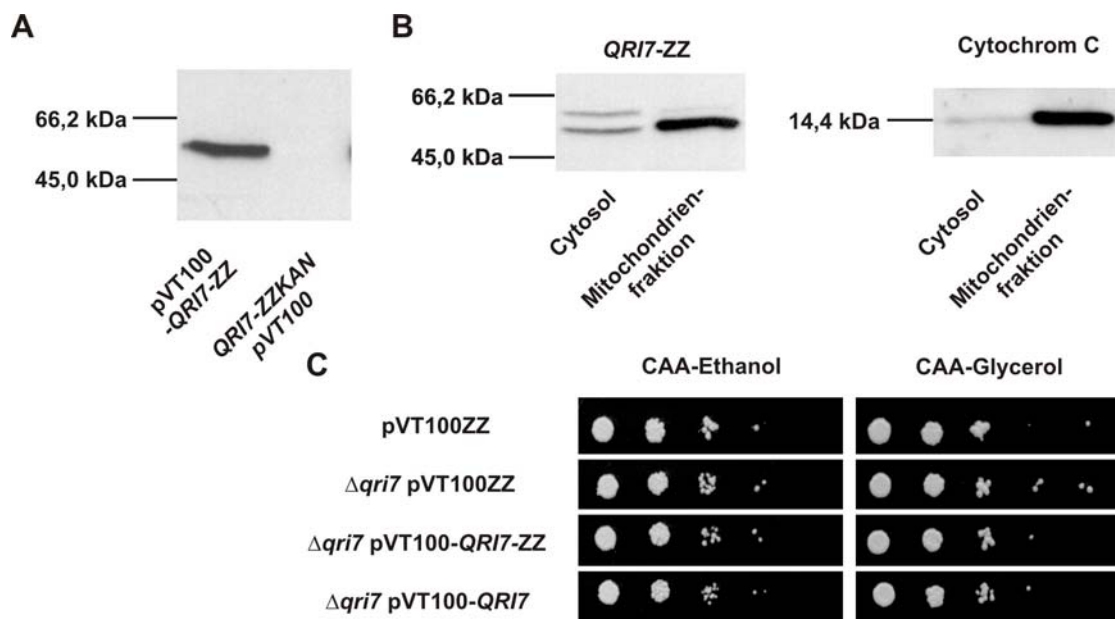
C: Analyse von Caspaseaktivität nach 4, 6 und 8 h bei restriktiver Temperatur mittels Durchflußzytometrie.

D: Die Kulturen wurden für 2 bis 10 h auf 37 °C umgesetzt und mittels des MoFlo Zellsorters auf Petrischalen mit YPD plattiert. Die Platten wurden für 4 Tage bei 25 °C inkubiert.

dem Caspaseaktivität nach Inkubation der Zellen mit FITC-VAD-FMK nachgewiesen wurde, konnte gezeigt werden, dass auch diese für apoptotische Zellen typische Proteaseaktivität nach 4, 6 und 8 h Inkubation bei 37 °C um je etwa 20% geringer ausfiel im Vergleich zu *wbp1-1* (Abb. II.21C). Wie nach den Resultaten aus Abbildung II.21A-C zu erwarten war, konnte auch ein Anstieg der Überlebensrate der *QRI7* Disruptante nach Inkubation für 2 bis 10 h bei restriktiver Temperatur festgestellt werden (Abb. II.21D). Der Wachstumsphänotyp der *wbp1-1* Mutante bei 31 °C konnte durch die Disruption von *QRI7* jedoch nicht unterdrückt werden (Ergebnis nicht gezeigt).

Da nach Deletion von *QRI7* in *wbp1-1* eine deutliche Abschwächung der analysierten apoptotischen Merkmale nachgewiesen werden konnte, sollte in den folgenden Versuchen überprüft werden, ob durch Überexpression von Qri7p der jeweilige Effekt umgedreht werden kann. Deswegen wurde in einem ersten Versuch die Überexpression von *QRI7* nach Klonierung in pVT100-ZZ im Vergleich zum genomisch markierten *QRI7*-ZZ, jeweils im *wbp1-1* Hintergrund, ermittelt (Abb. II.22A). Für das überexprimierte Protein Qri7 wurde ein starkes Signal auf der vorausberechneten Höhe von etwa 57kDa identifiziert (Abb. II.22A, linke Spur). Im Gegensatz dazu konnte für das in der Zelle genomisch exprimierte Qri7p-ZZ kein Signal detektiert werden, obwohl die 200-fache Menge an Protein aufgetragen worden war (Abb. II.22A, rechte Spur). Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass *QRI7* in der Zelle in einer sehr geringen Konzentration vorhanden war und deshalb ohne Anreicherung nicht nachgewiesen werden konnte. Wie Abbildung II.20 zeigt, konnte Qri7p nach Markierung mit RFP in den Mitochondrien detektiert werden. Um dies auch für das ZZ-Fusionskonstrukt zu bestätigen, wurde die Lokalisation von Qri7p-ZZ mittels SDS-PAGE in der

mitochondriellen Fraktion nachgewiesen werden (Abb. II.22B, linke Abbildung). Um eine Fragmentierung der Mitochondrienmembran während des Aufschlusses und einem damit verbundenen Ausstrom von Qri7p aus den Mitochondrien ins Cytosol auszuschließen, wurde als Kontrolle Cytochrom *c*, das im mitochondrialen Intermembranbereich lokalisiert ist, im Cytosol und in der Mitochondrienfraktion analysiert. Cytochrom *c* konnte jedoch nur in der Mitochondrienfraktion ermittelt werden, wodurch eine Beschädigung der Mitochondrien ausgeschlossen werden konnte. Somit scheint eine sehr geringe Menge an Qri7p-ZZ aufgrund der Überexpression im Cytosol anstatt in den Mitochondrien präsent zu sein. Die Funktionalität von mit zwei Protein A IgG Bindedomänen markiertem Qri7p sollte mit Hilfe eines Wachstumstests analysiert werden, da die Deletion von *QRI7*



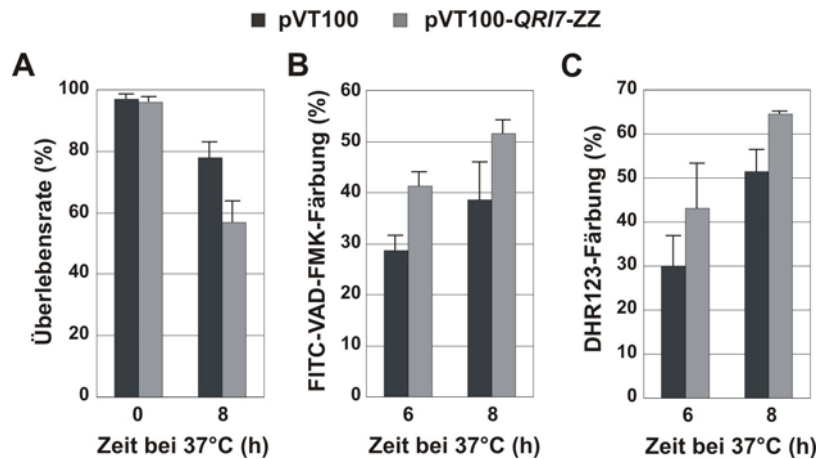
**Abbildung II.22: Überprüfung von Überexpression (A), Lokalisation (B) und Funktionalität (C) von Qri7p.**

**A:** Nach Glasperlenaufschluss wurden vom Überstand 0,012 OD Zellen (pVT100-QRI7-ZZ) und 2,5 OD Zellen (QRI7-ZZKAN pVT100) auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Western-Blot Analyse untersucht.

**B:** Sowohl vom Cytosol als auch von der Mitochondrienfraktion wurden 1 OD Zellen auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und QRI7-ZZ detektiert (links). Als Kontrolle wurden 3 OD Zellen derselben Isolate auf einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und Cytochrom C analysiert (rechts).

**C:** Wachstumsverhalten nach QRI7 Disruption in *wbp1-1* auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen. 3  $\mu$ l einer 1:10 Verdünnungsreihe startend mit  $10^6$  Zellen wurden auf 3% Ethanol- bzw. 2% Glycerol-Minimalmedium-Platten getüpfelt und für 4 Tage bei 25 °C inkubiert.

zu einem Wachstumsdefekt auf Medien mit nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen führte (Steinmetz *et al.*, 2002). Dieses von Steinmetz *et al.* veröffentlichte Ergebnis konnte in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt werden. Nach Inkubation von *wbp1-1* $\Delta qri7$  pVT100-ZZ in flüssigem Minimalmedium mit Ethanol (Abb. II.22C, links) oder Glycerol (Abb. II.22C, rechts) als Kohlenstoffquelle und anschließendem Wachstumstest auf eben diesen Platten konnte kein Wachstumsphänotyp festgestellt werden. Bezüglich der untersuchten apoptotischen Merkmale war das



**Abbildung II.23:** Überexpression von *QRI7-ZZ* (grau) in *wbp1-1* bei restriktiver Temperatur führt zu einer erhöhten Absterberate (A) und zu einem Anstieg der Caspaseaktivität (B) und ROS-Akkumulation (C).

Die Kulturen wurden in Minimalmedium ohne Uracil angezogen.

A: Die Kulturen wurden für 8 h auf 37 °C umgesetzt und mit Hilfe des MoFlo Zellsorters auf Platten mit Minimalmedium ausgebracht. Die Platten wurden für 4 Tage bei 25 °C inkubiert.

Caspaseaktivität (B) und ROS-Produktion (C) nach 6 und 8 h Inkubation der Kulturen bei restriktiver Temperatur. Die Zellen wurden mittels Durchflußzytometrie analysiert.

überexprimierte *Qri7p* funktionell, da es zu einer Veränderung der apoptotischen Phänotypen führte (siehe Abb. II.23). Nach Analyse der Überlebensrate von *wbp1-1* pVT100 und *wbp1-1* pVT100-*QRI7-ZZ* wurde durch Überexpression von *QRI7* nach 8 h bei restriktiver Temperatur eine Abnahme der Überlebensrate von 78% auf 57% nachgewiesen (Abb. II.23A). Ebenso stiegen Caspaseaktivität (Abb. II.23B) und ROS-Produktion (Abb. II.23C) der Zellen nach 6 und 8 h bei 37 °C um ca. 10 bis 15% an.

Sowohl Disruption als auch Überexpression von *QRI7* führten in *wbp1-1* zur Veränderung apoptotischer Merkmale nach Induktion des programmierten Zelltods mittels ER-Stress, was darauf hindeutet, dass *Qri7p* in die apoptotische Signalkaskade involviert sein könnte. Aufgrund seiner mitochondrialen Lokalisation liegt die Vermutung nahe, dass dieses Protein an der Bildung bzw. an der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt sein könnte. Dies ist jedoch zunächst Spekulation und bedarf weiterer Analysen.

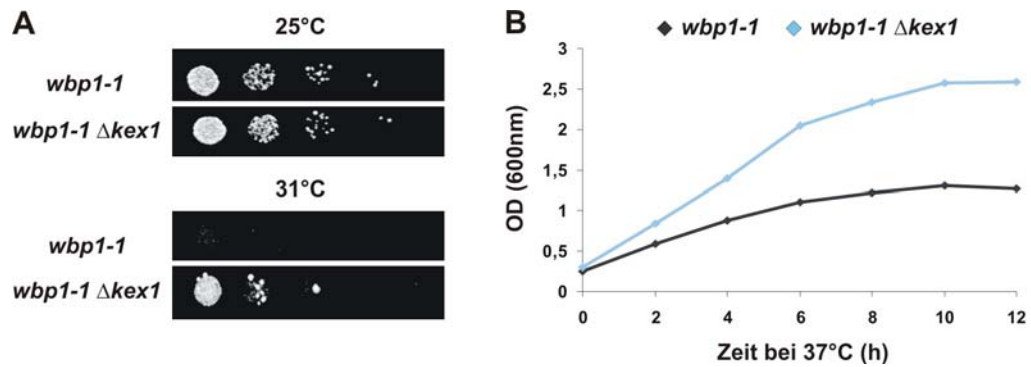
## II.3 Kex1p als Komponente der Signalkaskade des programmierten Zelltods in *S. cerevisiae*

*KEX1* („killer expression defective“) wurde als Serincarboxypeptidase charakterisiert, die eine Spezifität für basische Aminosäuren aufweist und für die Prozessierung sekretorischer Proteine benötigt wird (Cooper und Bussey, 1989; Dmochowska *et al.*, 1987). Die Protease ist im Golgi-Apparat lokalisiert und besitzt eine C-terminale Membranspanne, wobei die große Proteasedomäne am N-terminalen Ende ins Lumen des sekretorischen Transportwegs ragt (Cooper und Bussey, 1992). Bis jetzt sind zwei Substrate bekannt, die als inaktive Vorstufen den sekretorischen Transportweg durchlaufen und sowohl Kex1p als auch Ste13p und Kex2p für ihre Prozessierung benötigen: das  $\alpha$ -Faktor Peptid, das für die Paarung haploider Hefen notwendig ist, und das Killertoxin (Bussey, 1988; Fuller *et al.*, 1988).

### II.3.1 Analyse apoptotischer Merkmale nach Disruption von *KEX1*, *KEX2* und *YCA1* in *wbp1-1*

#### II.3.1.1 Wachstumsverhalten und Unterglykosylierung der Carboxypeptidase Y in *wbp1-1 $\Delta$ kex1*

Aufgrund der identifizierten Reduktion der Caspaseaktivität durch Deletion der Serincarboxypeptidase Kex1p im Wildtypstamm BY4741 nach Behandlung der Kultur mit Tunicamycin (Tab. II.7) wurde *KEX1* in *wbp1-1* mit einer *KAN*-Kassette disruptiert. In einem ersten Experiment wurde untersucht, ob durch Disruption von *KEX1* der beobachtete Wachstumsphänotyp der *wbp1-1* Mutante bei 31 °C unterdrückt werden kann, wie es bei Überexpression des anti-apoptotischen Faktors *Bcl-2* der Fall war (Abb. II.9C). Hierfür wurden die Zellen in einer 1:10 Verdünnungsreihe auf Vollmediumplatten getüpfelt und die Platten bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert. Nach viertägiger Inkubation bei einer Kontrolltemperatur von 25 °C wurde gleich gutes Wachstum der beiden Stämme *wbp1-1* und *wbp1-1 $\Delta$ kex1* festgestellt. Jedoch war nach Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 31 °C die N-Glykosylierungsmutante nicht mehr in der Lage zu wachsen. Erst durch Disruption der Kex1 Protease wurde der Wachstumsphänotyp, in ähnlichem Maße wie bei *Bcl-2* Überexpression, aufgehoben (Abb. II.24A). In einem weiteren Wachstumstest wurden beide Kulturen auf eine optische Dichte von 0,25 angezogen und für 12 h bei der nicht permissiven Temperatur von 37 °C inkubiert, wobei alle 2 h die OD bei 600 nm detektiert wurde. Ein Vorversuch ergab, dass sich *wbp1-1* bei Inkubation im Vollmedium bei 25 °C und einer Rotationsgeschwindigkeit von 270 rpm im Wasserbadschüttler alle 140 min verdoppelte, was ebenso auf *wbp1-1 $\Delta$ kex1* zutrif.

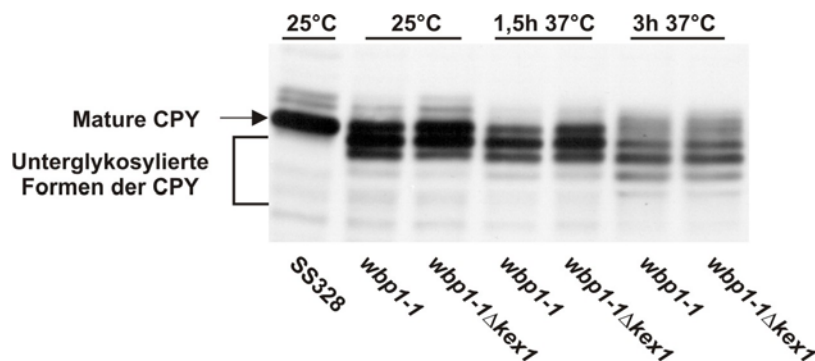


**Abbildung II.24: Disruption von KEX1 in *wbp1-1* unterdrückt den Wachstumsphänotyp von *wbp1-1* (A) und verbessert dessen Wachstumsverhalten bei 37 °C (B).**

A: Die Kulturen wurden bei 25 °C in YPD auf eine OD<sub>600</sub> von etwa 1 angezogen, 3 µl einer 1:10 Verdünnungsreihe startend mit 10<sup>6</sup> Zellen auf YPD Platten getipft und die Platten für 4 Tage bei 25 °C (oben) und 31 °C (unten) inkubiert.

B: Beide Stämme wurden auf eine OD<sub>600</sub> von 0,25 angezogen und anschließend auf 37 °C umgesetzt. Im Abstand von 2 h wurde die OD<sub>600</sub> beider Kulturen bestimmt.

Da durch die Disruption von Kex1p die Verdopplungszeit von *wbp1-1* nicht verändert wurde, konnten die beiden Wachstumskurven bei 37 °C aus Abbildung II.24B direkt miteinander verglichen werden. Nach dem „Temperaturshift“ auf 37 °C verdoppelte sich *wbp1-1* noch etwa zweimal, dann wurde die Teilungsgeschwindigkeit verlangsamt (nach etwa 4 h auf 37 °C) und letztendlich die Zellteilung bei einer Kultur-OD<sub>600</sub> von etwa 1,2 eingestellt. Dagegen führte die Disruption von KEX1 zu einem verbesserten Wachstumsverhalten der Kultur bei 37 °C. Die Zellen waren in der Lage sich länger zu verdoppeln (bis etwa 6 h bei 37 °C), wobei die Zellteilung bei einer Kultur-OD<sub>600</sub> von etwa 2,5 zum Erliegen kam (Abb. II.24B). Das verbesserte Wachstumsverhalten von *wbp1-1Δkex1* könnte auf zwei unterschiedliche Funktionen des Proteins zurückzuführen sein. Einerseits könnte Kex1p als proapoptotischer Faktor in die Signalkaskade des programmierten Zelltods involviert sein, andererseits könnte die Disruption von KEX1 zu einer verbesserten Glykosylierung führen. Um Letzteres



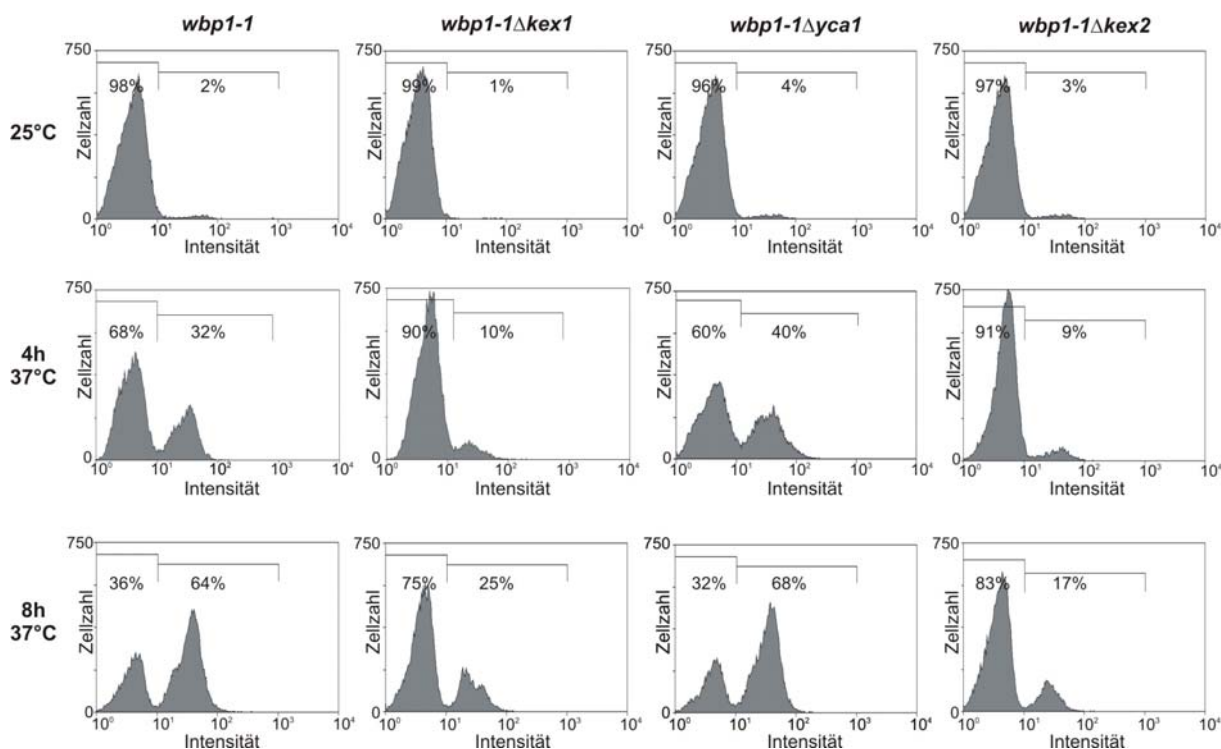
**Abbildung II.25: Radioaktive Markierung der Carboxypeptidase Y mit [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein in *wbp1-1* und *wbp1-1Δkex1*.**

Die Kulturen wurden bei 25 °C in YPD angezogen. Die OD<sub>600</sub> zum Zeitpunkt des „Temperaturshifts“ auf die nicht permissive Temperatur betrug für den Wildtyp SS328 0,7, für *wbp1-1* 0,75 und für *wbp1-1Δkex1* 1,0. Die Kulturen wurden für 1,5 bis 6 h auf 37 °C umgesetzt.

ausschließen zu können, wurde das N-Glykosylierungsmuster neu synthetisierter CPY nach „Temperaturshift“ der Kulturen auf 37 °C für unterschiedliche Zeitintervalle mittels radioaktiver Markierung mit [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein untersucht. In Wildtypzellen, inkubiert bei 25 °C, wurde lediglich die mature Form der CPY nachgewiesen (Abb. II.25, Spur 1 von links). In *wbp1-1* und *wbp1-1Δkex1* konnten bereits bei 25 °C neben der murenen CPY zwei weitere unterglykosylierte Formen identifiziert werden (Abb. II.25, Spur 2-3 von links), was zu einem verlangsamten Wachstum gegenüber dem korrespondierenden Wildtyp SS328 (Verdopplungszeit 110 min) führt. Durch das Umsetzen der Kulturen auf 37 °C wurde eine fortschreitende Unterglykosylierung, die in beiden Stämmen in gleichem Maße ausfiel, festgestellt (Abb. II.25, Spur 4-7 von links). Somit konnte nachgewiesen werden, dass die Zerstörung der Serincarboxypeptidase keine direkte Auswirkung auf den N-Glykosylierungsdefekt in *wbp1-1* hat.

### II.3.1.2 Analyse der Caspaseaktivität

Wie in Abschnitt II.2.2 bereits angesprochen, ist die „Yeast Caspase-1“ (*YCA1*) in einige, aber nicht in alle apoptotischen Signalkaskaden der Bäckerhefe involviert (siehe Abschnitt II.2.3.1). Ein weiteres Homologes zu Säugercaspasen wurde bislang nicht identifiziert. In dem nachfolgenden Abschnitt wurde analysiert, ob die Disruption von *YCA1* einen Einfluss auf die gemessene Caspaseaktivität hat.



**Abbildung II.26: Deletion von *KEX1* und *KEX2* vermindert im Vergleich zu *YCA1* die Caspaseaktivität nach Färbung der Zellen mit FITC-VAD-FMK.**

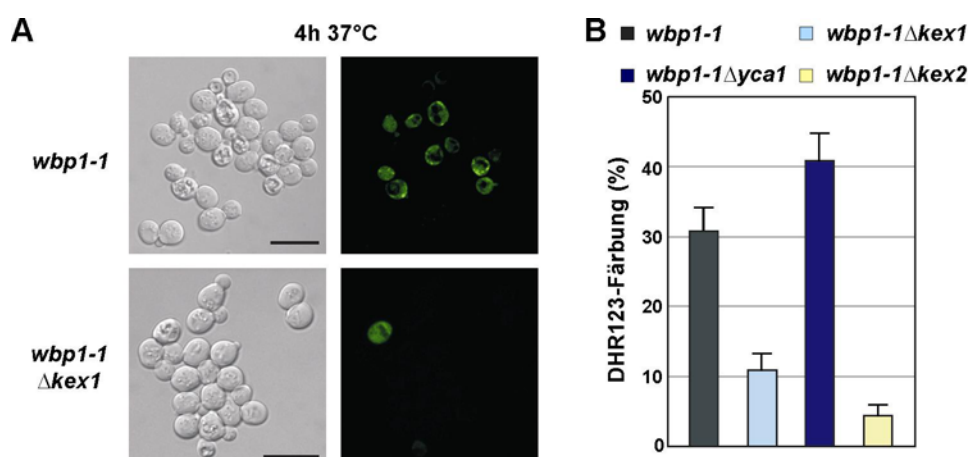
Die Kulturen wurden bei 25 °C in YPD angezogen und für 4 und 8 h auf die restriktive Temperatur umgesetzt. Anschließend wurden die Kulturen mit FITC-VAD-FMK inkubiert und die Caspase-positiven Zellen mittels Durchflußzytometrie identifiziert.



Die in dem Deletionsgenbank-Screen identifizierten Proteasen *KEX1* und *KEX2* wurden in *wbp1-1* disruptiert und direkt mit *wbp1-1* und *wbp1-1Δyca1* verglichen. Nach Inkubation der Kulturen bei permissiver Temperatur wurde eine zu vernachlässigende Caspaseaktivität zwischen 1% und 4% detektiert (Abb. II.26, obere Reihe). Durch einen „Temperaturshift“ auf 37 °C für 4 und 8 h zeigten 32% und 64% von *wbp1-1* (linke Spalte) und 40% und 68% von *wbp1-1Δyca1* (2. Spalte von rechts) Caspaseaktivität. Demgegenüber waren nur 10% und 25% bzw. 9% und 17% von *wbp1-1Δkex1* (2. Spalte von links) bzw. *wbp1-1Δkex2* (rechte Spalte) mit dem FITC-konjugierten und irreversibel bindenden Caspasehemmstoff markiert. Hierbei muss hinzugefügt werden, dass sich die Verdopplungszeit der *wbp1-1* Mutante durch die Disruption von *KEX2* von 140 min auf etwa 160 min verlängerte und ein stärkeres Verklumpen der Zellen eintrat, was jedoch auf die hier analysierte Caspaseaktivität und die anschließend untersuchte ROS-Produktion keine Auswirkungen hatte.

### II.3.1.3 Auswirkung der Disruptionen von *YCA1*, *KEX1* und *KEX2* in *wbp1-1* auf die ROS-Produktion

Nachdem ein Effekt nach Disruption von *KEX1* und *KEX2* bezüglich Caspaseaktivität nachgewiesen werden konnte, wurde in dem folgenden Experiment die Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies analysiert. Disruption von *KEX1* in *wbp1-1* führte zu einer deutlichen Minderung ROS-positiver Zellen nach 4 h bei 37 °C im Vergleich zu *wbp1-1* (Abb. II.27A). Für eine statistische Auswertung wurden mikroskopische Aufnahmen mit DHR123 inkubierten Kulturen verwendet und je Stamm ca. 500 Einzelzellen auf ROS-Produktion untersucht (Abb. II.27B). *Δkex1* (11%) und *Δkex2* (4%) zeigten beide eine verminderte Anzahl an Zellen mit ROS-Produktion im Vergleich zu *wbp1-1* (31%). Nach



**Abbildung II.27: Disruption von *KEX1* und *KEX2* reduziert die Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies im Gegensatz zu *YCA1*.**

Die Auswertung erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie.

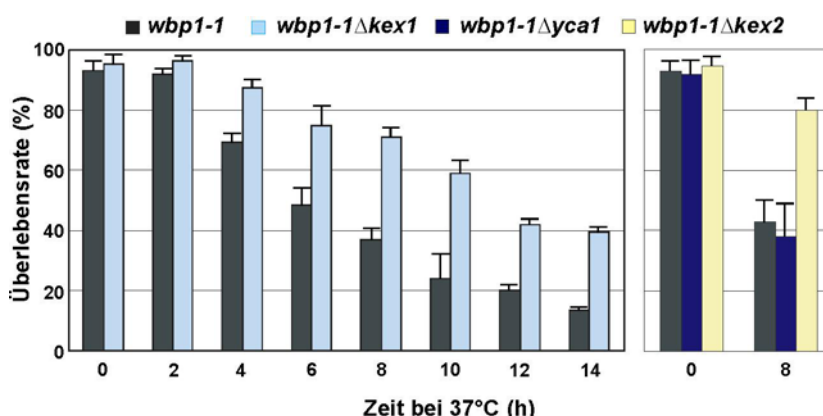
A: Die Kulturen wurden für 4 h bei 37 °C inkubiert. Die linken Aufnahmen zeigen den Durchlichtkanal, die rechten den grünen Kanal mit ROS-positiven Zellen. Die Balken entsprechen 10 μM.

B: Statistische Auswertung der ROS-Produktion von (A). Pro Stamm wurden etwa 500 Zellen analysiert.

Disruption der Hefecaspase wurde sogar eine Zunahme ROS-positiver Zellen auf 41% ermittelt. Da nach Auswertungen der mikroskopischen Aufnahmen von *wbp1-1* etwa 31% ROS-positive Zellen nachgewiesen werden konnten und dieser Wert nahezu identisch mit dem aus der durchflußzytometrischen Analyse war (32%, Abb. II.4C), konnten beide Methoden für die Quantifizierung Rhodamin-gefärbter Zellen verwendet werden.

### II.3.1.4 Untersuchung der Überlebensrate nach Disruption von *KEX1* und *KEX2*

Ein weiteres Merkmal der Apoptose ist das programmierte Absterben der Zellen. Abbildung II.24B zeigt, dass die *wbp1-1* Mutante durch den „Temperaturshift“ auf 37 °C mit der Zeit die Fähigkeit verliert, sich zu teilen. In diesem Experiment wurde die Überlebensrate von Protease defizienten Stämmen in *wbp1-1* nach Inkubation für 2 bis 14 h bei 37 °C analysiert. Um eine durch die Disruption veränderte Überlebensrate der Stämme zu untersuchen wurden diese über Nacht auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 bei der permissiven Temperatur von 25 °C angezogen. Bei dieser Temperatur konnte für alle untersuchten Stämme eine Überlebensrate von über 95% detektiert werden (Abb. II.28). Nach 4 h bei



**Abbildung II.28: Disruption der Proteasen *KEX1* und *KEX2* in *wbp1-1* verhilft den Zellen zu einer besseren Überlebensrate, wobei Deletion von *YCA1* keinen Effekt zeigt.**

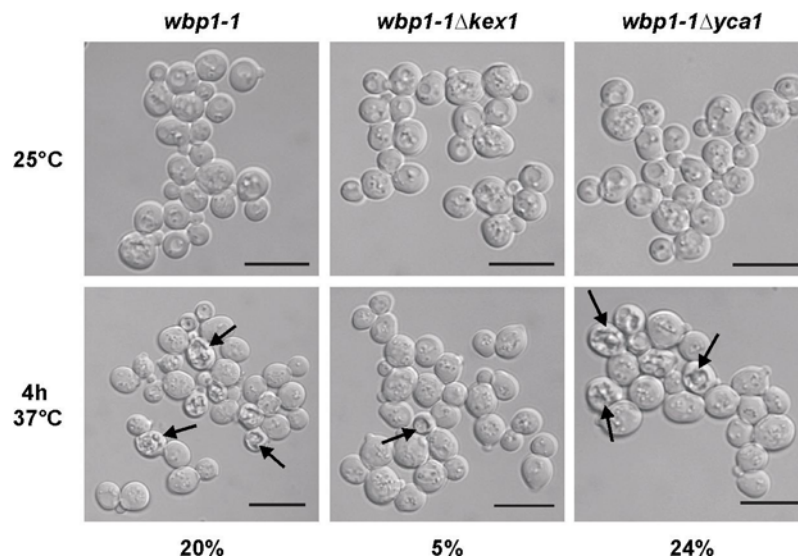
Die Kulturen wurden auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 – 0,25 angezogen, für die angegebene Zeit auf 37 °C umgesetzt und mittels des MoFlo Zellsorters auf Vollmediumagarplatten sortiert.

37 °C begann die Lebensfähigkeit von *wbp1-1* langsam aber stetig abzunehmen, bis schließlich nach 8 und 14 h bei restriktiver Temperatur noch 38% und 14% der Zellen fähig waren eine Kolonie zu bilden (Abb. II.28, links). Durch Disruption der Protease Kex1 wurde ein starker Anstieg der Überlebensrate nachgewiesen, nach 8 h überlebten noch 72%, nach 14 h 40% der Zellen (Abb. II.28, links). Auch 80% der Zellen der  $\Delta kex2$  Mutante konnten nach 8 h bei 37 °C noch zu einer Kolonie heranwachsen (Abb. II.28, rechts). Dagegen konnte in *wbp1-1Δyca1* (39% nach 8 h bei 37 °C) keine Veränderung der Überlebensrate im Vergleich zu *wbp1-1* (42% nach 8 h bei 37 °C) festgestellt werden. Die Überlebensraten von *wbp1-1* nach 8 h Inkubation bei 37 °C wichen im linken und rechten Diagramm leicht voneinander ab, da es sich hierbei um unterschiedliche Messreihen handelte.



### II.3.1.5 Veränderung der Zellmorphologie in *wbp1-1* nach Induktion des programmierten Zelltods

Bei der mikroskopischen Analyse von Caspaseaktivität und ROS-Akkumulation konnte eine mit der Inkubationszeit und -temperatur ansteigende Anzahl an Zellen identifiziert werden, die eine Veränderung der Zellmorphologie aufwiesen, was im Folgenden als „Schrumpfen“ der Zellen bezeichnet wird. Im Vergleich zur Inkubation bei permissiver Temperatur zeigten 20% der *wbp1-1* Zellen nach 4 h Inkubation bei 37 °C diese morphologischen Veränderungen (Abb. II.29, linke Spalte), die etwa im gleichen Maße in *wbp1-1Δyca1* identifiziert werden konnten (rechte Spalte).



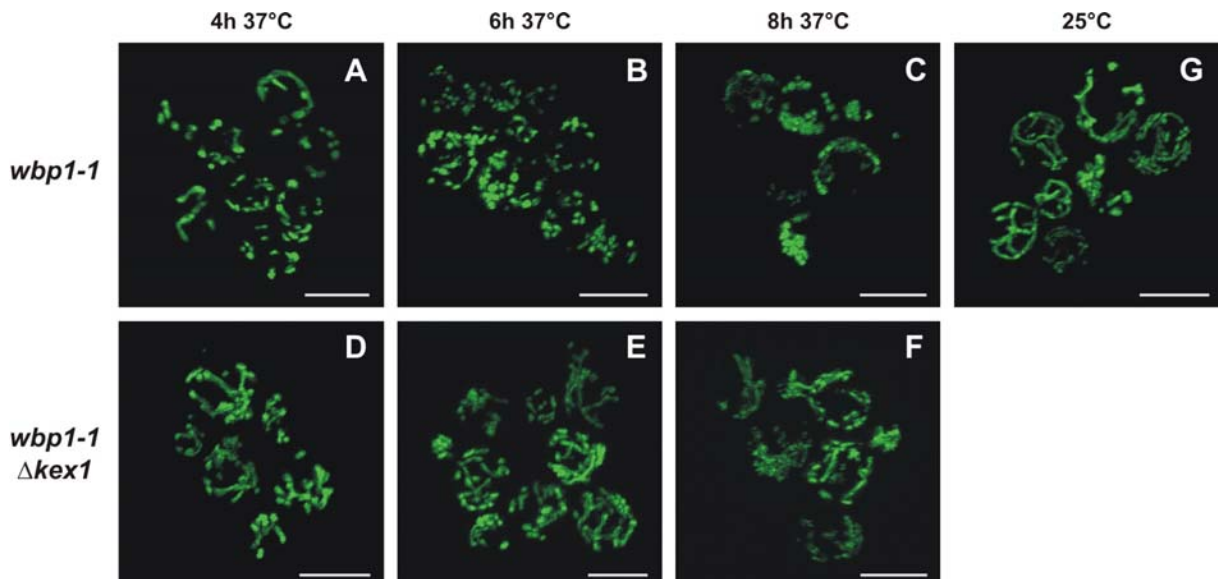
**Abbildung II.29: Disruption der Protease KEX1 minimiert das Schrumpfen der Zellen in *wbp1-1*.**

Die Zellen wurden bei 25 °C auf eine  $OD_{600}$  von 0,2 angezogen und für 4 h bei restriktiver Temperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Analyse der Zellen mittels konfokaler Mikroskopie. Für die statistische Auswertung wurden 500 Zellen untersucht. Die Schwarzen Pfeile zeigen einige der geschrumpften Zellen. Die Balken entsprechen 10 µM.

Dagegen zeigten nur 5% der *wbp1-1Δkex1* Zellen diesen morphologischen Phänotyp (mittlere Spalte). Auffällig war zudem, dass die geschrumpften Zellen meist über ein oder mehrere große, runde Kompartimente verfügten, was an vakuoläre Strukturen erinnert. Auf diese Beobachtung wird in Kapitel II.4 detaillierter eingegangen.

### II.3.1.6 Reduktion der Mitochondrienfragmentierung in *wbp1-1Δkex1*

Wie unter Kapitel II.1.1.3 diskutiert wurde, konnte nach Induktion der Apoptose in *wbp1-1* eine zunehmende Fragmentierung der Mitochondrien beobachtet werden. Es stellte sich die Frage, ob dieser Phänotyp durch Disruption von *KEX1* reduziert oder gar vollends aufgehoben werden kann. Hierfür wurde *wbp1-1Δkex1* mit dem unter II.1.1.3 beschriebenen Plasmid pVT100-mt-GFP transformiert und wie *wbp1-1* für 4, 6 und 8 h auf die restriktive Temperatur umgesetzt. Wie aus Abbildung II.30 deutlich wird, führte die Disruption von *KEX1* zu einer starken Verzögerung der Mitochondrienfragmentierung. In *wbp1-1* nahmen die tubulären Strukturen im Vergleich zur bei 25 °C inkubierten Kontrolle (Abb. II.30G) nach 4 h bei 37 °C stark ab (Abb. II.30A) und konnten nach 6 h und 8 h bei restriktiver Temperatur nicht mehr identifiziert werden (Abb. II.30B-C). Im Gegensatz



**Abbildung II.30: Verlauf der mitochondrialen Fragmentierung in *wbp1-1* und *wbp1-1Δkex1*.**

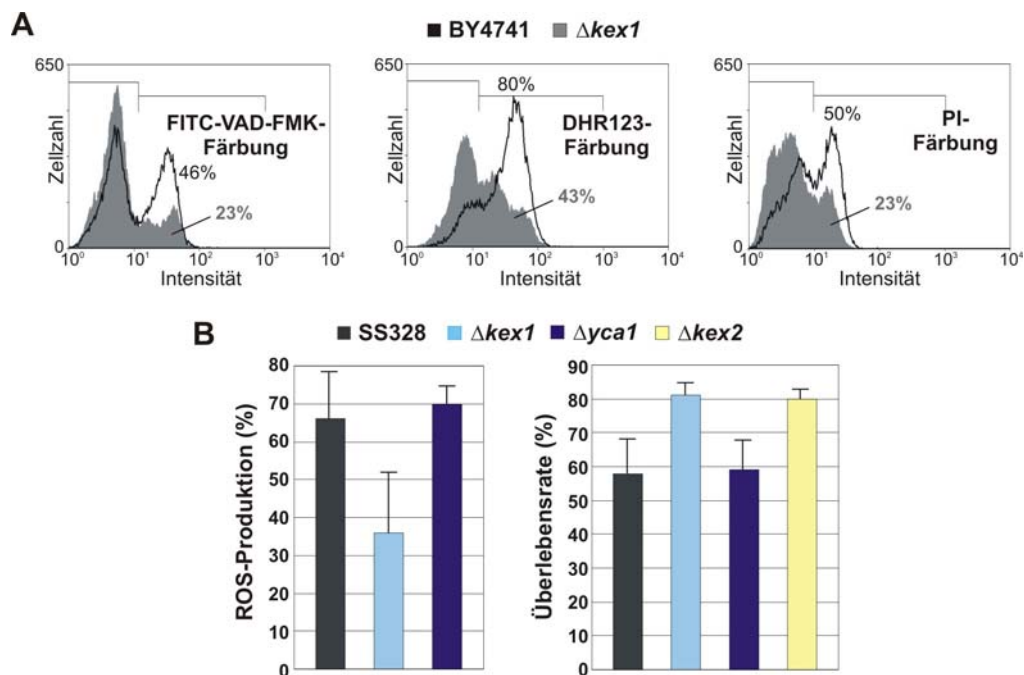
Die Kulturen wurden bei 25 °C auf eine  $OD_{600}$  von 0,2 angezogen und anschließend für 4, 6 und 8 h bei 37 °C inkubiert (*wbp1-1* A-C; *wbp1-1Δkex1* D-F). Als Kontrolle wurde *wbp1-1* bei 25 °C angezogen und analysiert (G).

dazu war in *wbp1-1Δkex1* nach 4h bei 37 °C ein noch deutlich erkennbares mitochondrielles Netzwerk zu beobachten (Abb. II.30D), dessen Fragmentierung auch nach 6 und 8 h bei 37 °C bei weitem noch nicht abgeschlossen war (Abb. II.30E-F). Dieser stark verlangsamte Umbau der Mitochondrien deutet darauf hin, dass *KEX1* relativ früh in die Signalkaskade des programmierten Zelltods involviert zu sein scheint.

## II.3.2 Beteiligung von Kex1p am programmierten Zelltod ausgelöst durch weitere Stressfaktoren

### II.3.2.1 Reduktion apoptotischer Merkmale durch Disruption von *KEX1* und *KEX2* nach Inhibition der N-Glykosylierung durch Tunicamycin

Wie in Kapitel II.1.2 gezeigt, führt die Hemmung der N-Glykosylierung durch Inkubation der Zellen mit 10 µg/ml Tunicamycin zu einem Anstieg von Caspaseaktivität, ROS-Akkumulation und PI-positiven Zellen. Durch die Disruption der Protease *KEX1* wurde im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp BY4741 sowohl Caspaseaktivität nach Inkubation der Zellen mit FITC-VAD-FMK von 46% auf 23% (Abb. II.31A, links), als auch die ROS-Produktion von 80% auf 43% (Abb. II.31A, Mitte) und die Anzahl an PI-positiven Zellen von 50% auf 23% (Abb. II.31A, rechts) reduziert. In einem weiteren Experiment wurde ROS-Akkumulation im Wildtypstamm SS328 und in den isogenen  $\Delta kex1$  und  $\Delta yca1$  Disruptanten mikroskopisch detektiert, wobei für die statistische Untersuchung etwa 500 Zellen ausgewertet wurden. Im Mittel waren 67% der Wildtypzellen ROS-positiv, wobei die Disruption von *KEX1* zu einem Rückgang auf 37% führte. Dagegen zeigten 70% von SS328 $\Delta yca1$  eine Anreicherung reaktiver Sauerstoffspezies (Abb. II.31B, links). Wenn man die



**Abbildung II.31: Auswirkung der *KEX1*-Deletion in Wildtypstämmen auf apoptotische Merkmale.**

Die Behandlung der Kulturen erfolgte jeweils für 8 h bei 37 °C mit 10 µg/ml Tunicamycin.

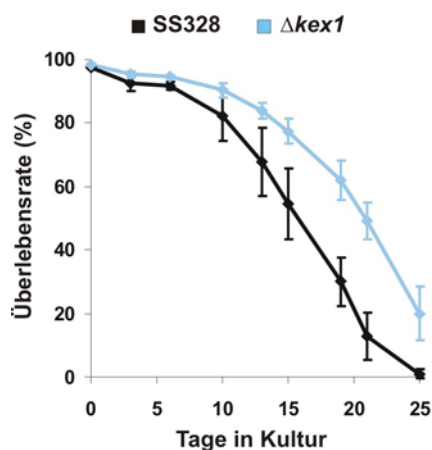
A: Caspaseaktivität (links), ROS-Produktion (Mitte) und PI-positive Zellen (rechts) nach Hemmung der N-Glykosylierung. Die Analysen erfolgten mittels Durchflußzytometrie.

B: Mikroskopische Auswertung von ROS-Akkumulation der Stämme SS328,  $\Delta kex1$  und  $\Delta yca1$  (links). Überlebensrate von SS328,  $\Delta kex1$ ,  $\Delta yca1$  und  $\Delta kex2$ . Zur Bestimmung der Überlebensrate wurden die Zellen mit dem Zellsorter auf YPD-Platten aufgebracht und für 3-4 Tage bei 25 °C inkubiert (rechts).

Menge an positiven Zellen der beiden Wildtypstämme BY4741 und SS328 miteinander vergleicht wird deutlich, dass es nur zu geringen Abweichungen bezüglich der ROS-Akkumulation kam. Diese Abweichung, die bei weiteren analysierten Wildtypstämmen festgestellt worden war, könnte möglicherweise auf den etwas unterschiedlichen genetischen Hintergrund der Stämme zurückzuführen sein. Unter den oben genannten Inkubationsbedingungen wurde des Weiteren die Überlebensrate von SS328 mit den korrespondierenden Proteasedisruptanten verglichen. Im Gegensatz zu SS328 konnte durch Disruption von *KEX1* und *KEX2* die Überlebensrate von 58% auf 81% und 82% angehoben werden (Abb. II.31B, rechts). Dagegen zeigte eine *Aycal* Disruptante (59%) eine ähnliche Überlebensrate wie der Wildtypstamm SS328 (Abb. II.31B, rechts). Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass sowohl Kex1p als auch Kex2p, in die Kaskade des PCD involviert sind.

### II.3.2.2 Verlängerung der Lebensspanne in *Δkex1* im Vergleich zum Wildtyp

Chronologisches Altern einer Kultur führt in Wildtypstämmen von *S. cerevisiae* zu apoptotischen Merkmalen wie Chromatinkondensation, DNA-Fragmentierung, Phosphatidylserintranslokation und ROS-Akkumulation (Herker *et al.*, 2004). Da die Disruption von *KEX1* zur drastischen Verminderung apoptotischer Marker in *wbp1-1* führte, wurde im folgenden Experiment untersucht, ob die Deletion der Protease in einer verlängerten Lebensspanne des Wildtypstammes resultiert. Hierfür wurden beide Kulturen für 25 Tage in einem Wasserbadschüttler bei 25 °C und 270 rpm inkubiert und zu den angegebenen Messpunkten die Überlebensrate bestimmt. Nach sechs Tagen in Kultur waren mehr als 90% der Zellen beider Stämme zu Wachstum fähig. Dann knickten beide Wachstumskurven ab, die des Wildtyps SS328 jedoch bedeutend schneller als die der Mutante (Abb. II.32). Die Disruption von *KEX1* hatte beispielsweise im Vergleich zum Wildtypstamm nach 15 Tagen Inkubation einen Anstieg der Überlebensrate von 53% auf 76%, nach 21 Tagen von 12% auf 48% zur Folge. Somit scheint Kex1p auch in dieser apoptotischen Signalkaskade involviert zu sein.



**Abbildung II.32: Chronologisches Altern in SS328 und SS328Δkex1.**

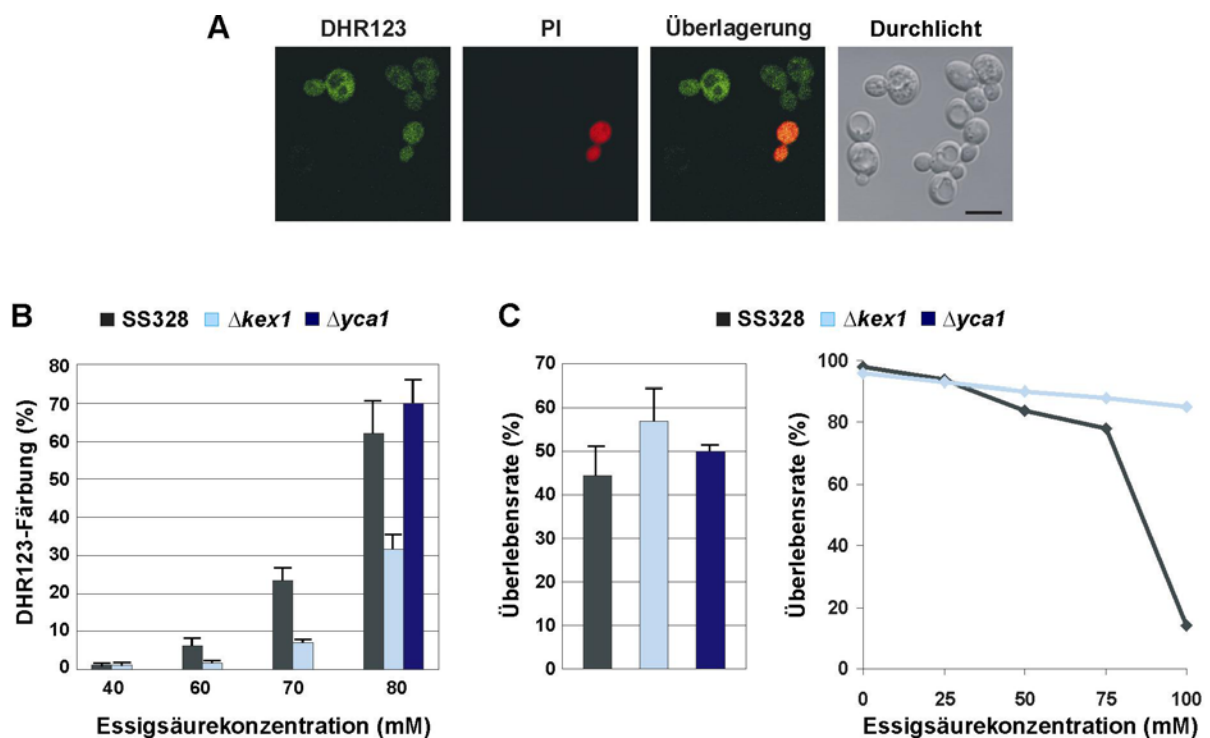
Aus einer frischen Übernachtskultur wurden die beiden Stämme SS328 (Wildtyp) und *Δkex1* in 30 ml YPD bei 25 °C auf eine  $OD_{600}$  von 0,2 angeimpft. Zu diesem Zeitpunkt wurden die ersten Proben entnommen und auf YPD Platten plattiert (entspricht 0 Tage in Kultur). Die Kulturen wurden für 25 Tage weiter bei 25 °C inkubiert und zu den angegebenen Messzeiten Proben entnommen und plattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte für 3-4 Tage bei 25 °C.

### II.3.2.3 Deletion von *KEX1* reduziert apoptotische Phänotypen nach Induktion von Apoptose mittels Essigsäurestress

In *S. cerevisiae* konnten durch Behandlung von Wildtypzellen mit extrazellulären Stressstimuli apoptotische Merkmale nachgewiesen werden. Zu diesen Stressstimuli gehört unter anderem die Essigsäure. Nach Inkubation der Kulturen mit 20-200 mM Essigsäure für 200 min bei pH 3 (dieser saure pH-Wert ist notwendig, da Essigsäure nur in der undissoziierten Form gut von Zellen aufgenommen werden kann) starben die Zellen ab, wobei dies bis zu einer Essigsäurekonzentration von 80 mM apoptotisch, bei Essigsäurekonzentrationen zwischen 120-200 mM nekrotisch von statten ging. In Zellen, die mit niedrigen Essigsäurekonzentrationen behandelt worden waren, wurden apoptotische Phänotypen wie Chromatinkondensation, DNA-Fragmentierung und Translokation von Phosphatidylserin von der inneren Schicht der Plasmamembran zur äußeren nachgewiesen (Ludovico *et al.*, 2001). In einer weiteren Arbeit wurde gezeigt, dass in diesen durch Essigsäure induzierten apoptotischen Signalweg, Mitochondrien eine zentrale Rolle einnehmen. Neben der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies wurde eine Freisetzung von Cytochrom *c* vom mitochondriellen Intermembranbereich ins Cytosol identifiziert (Ludovico *et al.*, 2002).

In diesem Abschnitt wurde untersucht, ob in Zellen ohne Kex1p der durch Essigsäurestress ausgelöste Zelltod reduziert werden konnte. Hierfür wurde in einem ersten Experiment ROS-Produktion nach Inkubation der Kulturen für 200 min in YPD (pH 3) mit 80 mM Essigsäure mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. Nach Inkubation der Zellen mit DHR123 (Abb. II.33A, links) und PI (Abb. II.33A, 2. von links) zeigte sich, dass viele Zellen eine positive Färbung für ROS-Akkumulation aufwiesen, PI jedoch durch die intakte Plasmamembran ausgeschlossen wurde. Vereinzelt Zellen, deren Plasmamembranintegrität verloren gegangen war, zeigten eine positive Färbung für beide Farbstoffe (Abb. II.33A, 2. von rechts). Somit konnte auch in diesem Wildtypstamm bis zu einer Essigsäurekonzentration von mindestens 80 mM Apoptose ausgelöst werden. Um eine mögliche Beteiligung von Kex1p in dieser apoptotischen Signalkaskade zu untersuchen, wurden Wildtyp und *Δkex1* Disruptante mit 40, 60, 70 und 80 mM Essigsäure behandelt und die ROS-Produktion durchflußzytometrisch analysiert (Abb. II.33B). Nach 200 min Inkubation bei 25 °C in YPD (pH 3) wiesen 23% (70 mM) bzw. 62% (80 mM) der Wildtypzellen ROS-Akkumulation auf, *Δkex1* dagegen nur 7% (70 mM) bzw. 31% (80 mM). Der nekrotische Anteil der Zellen beider Stämme betrug zwischen 5% und 8% nach Inkubation mit 80 mM Essigsäure, was durch Co-Färbung mit PI bestimmt wurde (Ergebnis nicht gezeigt). Im Gegensatz zu *Δkex1* zeigte die Deletion von *YCA1* einen entgegengesetzten Effekt. Inkubation mit 80 mM Essigsäure hatte einen Anstieg der ROS-positiven Zellen auf 70% im Vergleich zum Wildtyp mit 62% zur Folge (Abb. II. 33B). Ein durch Umsetzen der Kultur auf 37°C zusätzlich ausgeübter Zellstress führte bei Behandlung der Wildtypkultur mit nur 40 mM Essigsäure zu mehr als 90% nekrotischen Zellen, wobei lediglich 9% davon auch eine positive Färbung für ROS-Produktion zeigten (Ergebnis nicht gezeigt).

Des Weiteren wurde die Überlebensrate nach Disruption der Proteasen untersucht. Die Behandlung der Kulturen mit 85 mM Essigsäure führte bei *Δkex1* zu einer gesteigerten Überlebensfähigkeit (57%) im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp (44%) oder der *Δyca1* Mutante (50%) (Abb. II.33C, links). Dies wurde auch nach Inkubation von Wildtyp und *Δkex1* mit unterschiedlichen Essigsäurekonzentrationen von 0-100 mM deutlich (Abb. II.33C, rechts). Ab einer Konzentration von 75 mM begannen Wildtypzellen langsam abzusterben, wohingegen die Mutante noch ein sehr gutes Wachstumsverhalten, auch bei 100 mM Essigsäurekonzentration aufzeigte (Abb. II.33C, rechts, dieses Experiment wurde nur einmal durchgeführt). Der letzte Messwert fällt im Vergleich zur Überlebensrate (Abb. II.33C, links) etwas hoch aus. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass dieses Experiment nur einmal durchgeführt wurde. Dennoch wird das bessere Wachstumsverhalten der Mutante aus der Graphik deutlich. In einem weiteren Versuchsansatz wurden Wildtyp und *Δkex1* für 200 min bei 25 °C mit Essigsäurekonzentrationen zwischen 0 bis 225 mM in YPD ohne eingestellten pH-Wert inkubiert und die Überlebensrate analysiert (der pH-Wert lag zwischen 5 und 6, abhängig vom verwendeten H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>). Beide Kulturen zeigten aufgrund des höheren



**Abbildung II.33: Disruption von KEX1 im Wildtyp SS328 vermindert die ROS-Produktion und verbessert die Überlebensrate nach Induktion der Apoptose durch Essigsäurestress.**

Der pH-Wert des Inkubationsmediums (YPD) betrug pH=3.

**A:** Mikroskopische Analyse der ROS-Akkumulation in SS328. Die Zellen wurden für 200 min mit 80 mM Essigsäure bei 25 °C inkubiert und mit DHR123 und PI gefärbt. Der Balken entspricht 10 µm.

**B:** Durchflußzytometrische Analyse der ROS-Produktion in SS328 und *Δkex1*. Die Zellen wurden mit 40 mM bis 80 mM Essigsäure behandelt und anschließend mit DHR123 und PI (nicht gezeigt) gefärbt. *Δyca1* wurde mit 80 mM Essigsäure inkubiert und die ROS-Akkumulation mikroskopisch analysiert.

**C:** Überlebensrate von SS328, *Δkex1* und *Δyca1*. Die Kulturen wurden für 200 min mit 85 mM Essigsäure (links) oder mit unterschiedlicher Essigsäurekonzentration von 0-100 mM (rechts) inkubiert und anschließend mit dem Zellsorter sortiert.

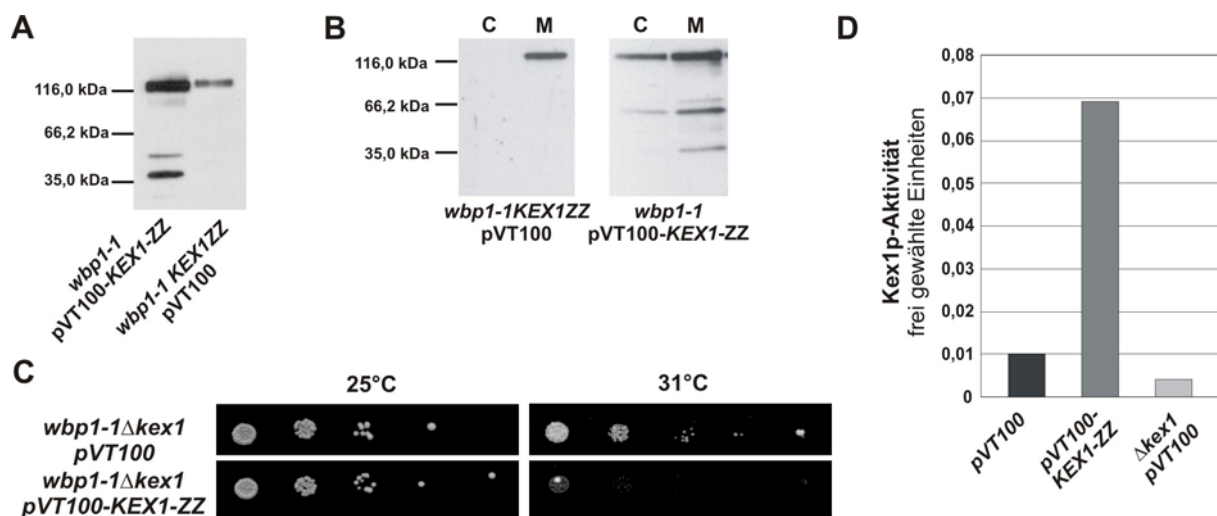
pH-Werts des Mediums eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Essigsäurestress. Dies war auf die höhere Menge an dissoziierter, geladener Essigsäure im Medium zurückzuführen, die von den Zellen nicht mehr in dem Maße wie ungeladene Essigsäure aufgenommen werden konnte. Abgesehen davon wurde wiederum ein verbessertes Überleben der *kex1* Mutante festgestellt (Ergebnis nicht gezeigt). Die Beteiligung der „Yeast Caspase-1“ bei Essigsäurestress wird immer noch kontrovers diskutiert. Obwohl Yca1p als ein Exekutor der Essigsäure-induzierten Apoptose beschrieben wurde (Madeo *et al.*, 2002) und in einer weiteren Arbeit eine gering verbesserte Überlebensfähigkeit der  $\Delta yca1$  Disruptante nachgewiesen wurde (Guaragnella *et al.*, 2006), konnte dieser Metacaspase wenn überhaupt nur eine geringere Beteiligung an diesem apoptotischen Signalweg zugewiesen werden (Saraiva *et al.*, 2006). Letztere Beobachtung korrespondiert mit den in den Abbildungen II.33B-C gezeigten Resultaten, dass die Deletion von *YCA1* zu keiner Verminderung der ROS-Akkumulation und Absterberate führte.

### **II.3.3 Auswirkungen der Kex1p Überexpression in *wbp1-1***

Aufgrund der dargelegten Ergebnisse unter II.3.1 bis II.3.2 wird deutlich, dass Kex1p eine wichtige Rolle für den korrekten Ablauf des programmierten Zelltods spielt. Deswegen sollte nachfolgend analysiert werden, in wieweit Überexpression von Kex1p Einfluss auf apoptotische Phänotypen und Überlebensraten nimmt. Hierzu wurde die Überexpression von Kex1p in *wbp1-1* untersucht. Da Kex1p eine Transmembranspange besitzt (Cooper und Bussey, 1992) wurden Membranen von *wbp1-1*-Kulturen isoliert, die Kex1p-ZZ auf einem Plasmid oder genomisch exprimierten, und mittels „Western-Blot“ analysiert (Abb. II.34A). Es zeigte sich eine deutlich erhöhte Konzentration an Kex1p-ZZ in den Membranen des überexprimierenden Stamms (Abb. II.34A, linke Spur) im Vergleich zur genomisch markierten Variante (Abb. II.34A, rechte Spur). Das mit dem ZZ-Epitop markierte Protein zeigte ein etwas höheres Laufverhalten als erwartet (anstelle von den berechneten 94 kDa erschien das Signal bei etwa 116 kDa) was jedoch für Membran- und N-glykosylierte Proteine nicht ungewöhnlich ist. Neben der maturen Form wurden zwei weitere Banden zwischen 35 und 50 kDa nach Überexpression von Kex1p identifiziert (Abb. II.34A, linke Spur), die degradierte Varianten des Proteins darstellen. Da Überexpression von Proteinen zu deren Fehllokalisation führen kann, wurden Cytosol- und Membranfraktion auf Kex1p-ZZ Signale hin untersucht. In der genomisch mit Protein A markierten Kex1p Variante wurde für Kex1p-ZZ, wie erwartet, lediglich ein Signal in der Membranfraktion detektiert (Abb. II.34B, links), wohingegen nach Überexpression das Protein auch in geringer Konzentration im Cytosol nachgewiesen werden konnte (Abb. II.34B, rechts). Diese partielle Misslokalisation könnte bei der Analyse apoptotischer Phänotypen zu einer Beeinträchtigung der Ergebnisse führen, da durch die Präsenz der Protease im Cytosol möglicherweise weitere, sonst unzugängliche Substrate gespalten werden könnten. Die Aktivität und Funktionalität von Kex1p-ZZ



wurde sowohl *in vivo* als auch *in vitro* analysiert. Wie in Abbildung II.24A bereits dargestellt, führte die Deletion von *KEX1* in *wbp1-1* zu einem verbesserten Wachstumsverhalten bei 31 °C. Aufgrund dieses Resultats konnte die Funktionalität von Kex1p-ZZ in einem *in vivo* Experiment analysiert werden. Die *KEX1* Disruptante wurde mit dem Überexpressionsvektor pVT100-*KEX1*-ZZ und dem entsprechenden Leervektor transformiert, über Nacht auf eine OD<sub>600</sub> zwischen 0,5 und 1 angezogen und wie in der Legende zu Abbildung II.34C beschrieben getüpfelt und inkubiert. Nach viertägiger Inkubation auf CAA-Agarplatten bei 31 °C zeigte die Deletionsmutante *wbp1-1Δkex1* ein gutes Wachstum. Dagegen konnte durch Überexpression von Kex1p-ZZ in *wbp1-1Δkex1* der Wachstumsphänotyp von *wbp1-1* wiederhergestellt werden, was zeigt, dass das Epitop die Funktionalität der Protease nicht beeinflusst. (Abb. II.34C). Danach sollte untersucht werden, ob



**Abbildung II.34: Lokalisations- und Funktionalitätsanalyse von Kex1p in *wbp1-1*.**

**A:** Expressionsnachweis von überexprimierten (linke Spur) und genomischen (rechte Spur) mit Protein A markiertem Kex1p mittels „Western Blot“ Analyse. Pro Spur wurden 0,5 OD Zellen der Membranfraktion auf ein 8%iges SDS Gel aufgetragen.

**B:** Lokalisation von überexprimierten (rechts) und genomischen mit Protein A markiertem Kex1p mittels „Western Blot“ Analyse. Es wurden 0,5 OD Zellen der Cytosol- und Membranfraktion auf ein 8%iges SDS Gel aufgetragen. C = Cytosolfraction, M = Membranfraktion.

**C:** *in vivo* Funktionalitätstest mittels Wachstumsanalyse. Die Kulturen wurden bei 25 °C in CAA angezogen, 10<sup>7</sup> Zellen geerntet, je 3 µl einer 1:10 Verdünnungsreihe startend mit 10<sup>6</sup> Zellen auf CAA-Platten getüpfelt und für 4 Tage bei 25 °C und 31 °C inkubiert.

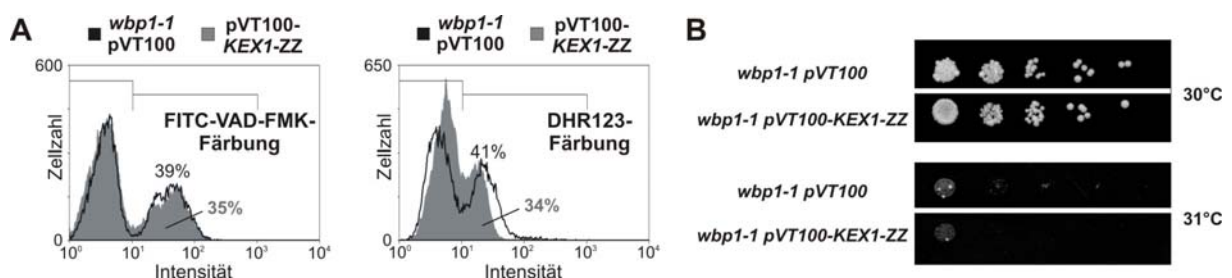
**D:** *in vitro* Funktionalitätstest. Umsatz von FA-Ala-Arg-OH durch immunpräzipitiertes Kex1p-ZZ.

solubilisiertes und anschließend präzipitiertes Kex1p-ZZ in der Lage ist, das Caspasesubstrat Ac-VEID-AMC zu spalten. Hierfür wurde zunächst die Aktivität des Kex1p-ZZ Präzipitats *in vitro* durch Spaltung von FA-Ala-Arg-OH spektrophotometrisch überprüft (Latchinian-Sadek und Thomas, 1993; Plummer und Kimmel, 1980). Im Vergleich zu den beiden Kontrollen *wbp1-1* pVT100 und *wbp1-1Δkex1* pVT100 führte die Überexpression von Kex1p-ZZ in *wbp1-1* zu einer Aktivitätszunahme von 0,01 auf 0,07 (Abb. II.34D). Anschließend wurde das Kex1p-ZZ Präzipitat verwendet, um die Spaltung des Caspasesubstrats Ac-VEID-AMC fluorimetrisch zu untersuchen. Die Analyse beruht auf der Zunahme emittierter Fluoreszenz bei 440 nm nach Abspaltung von Ac-VEID



vom dann fluoreszierenden Chromophor 7-Amino-4-Methylcoumarin (AMC). Trotz Überexpression von Kex1p konnte keine Spaltung des Substrats nach Inkubation des Reaktionsansatzes zwischen 2 und 6 h im Vergleich zu den oben genannten Kontrollen festgestellt werden (Ergebnis nicht gezeigt). Die Ergebnisse zeigen, dass Kex1p trotz nachgewiesener funktioneller Proteaseaktivität nicht in der Lage ist, das für Säuger typische Caspasesubstrat zu spalten.

In weiteren Versuchen wurde nun untersucht, wie sich eine Überexpression von Kex1 auswirkt. Caspaseaktivität wurde nach Inkubation der Kex1p überexprimierenden *wbp1-1* Mutante und der entsprechenden Kontrolle nach 8 h Inkubation bei 37 °C mit dem FITC-konjugierten Breitband Caspasehemmstoff FITC-VAD-FMK durchflußzytometrisch nachgewiesen. 39% der Zellen des Kontrollstamms *wbp1-1* pVT100 wiesen Caspaseaktivität auf, die durch Überexpression von *KEX1*



**Abbildung II.35: Überexpression von *KEX1* führt zu keiner Veränderung der analysierten apoptotischen Merkmale.**

A: Durchflußzytometrische Analyse von Caspaseaktivität (links, 8 h 37 °C) bzw. ROS-Akkumulation (rechts, 6 h 37 °C) in *wbp1-1* pVT100 (schwarz) und *wbp1-1* pVT100-KEX1-ZZ (grau) nach Inkubation der Kulturen bei restriktiver Temperatur.

B: Wachstumsverhalten von *wbp1-1* pVT100 und *wbp1-1* pVT100-KEX1-ZZ nach Inkubation der Kulturen in CAA-Medium. Je Kultur wurden 3 µl einer 1:10 Verdünnungsreihe startend mit 10<sup>6</sup> Zellen auf CAA-Platten getüpfelt und für 4 Tage bei 30 °C und 31 °C inkubiert.

nahezu nicht verändert wurde (Abb. II.35A, links). Ebenso verhielt es sich mit der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies nach Inkubation der Kulturen für 6 h bei restriktiver Temperatur. Auch hier konnte nur eine sehr geringe Abweichung ROS-positiver Zellen zwischen Kontrolle (34%) und *KEX1* Überexpression (41%) nachgewiesen werden (Abb. II.35A, rechts). Es fiel auf, dass sich durch Inkubation einer exponentiell wachsenden Kultur der *wbp1-1* pVT100 Mutante in CAA-Medium die Verdopplungszeit veränderte. Im Vergleich zu *wbp1-1* inkubiert in YPD-Medium verlängerte sich die Generationszeit von 140 min auf 180-200 min. Dies deutet auf einen verlangsamten Stoffwechsel der im Minimalmedium inkubierten Kulturen hin, was die geringere Menge an gefärbten Zellen bei gleicher Inkubationszeit erklärt (siehe II.1C und II.4C). Auch zeigten etwa 10-15% der in CAA-Medium kultivierten Zellen mehr ROS-Akkumulation als Caspaseaktivität, was im Gegensatz zur Inkubation in YPD Medium nicht der Fall war (siehe Abb. II.1 und II.4). Dies könnte mit dem verlangsamten Metabolismus der Zellen zusammenhängen. In einem weiteren Experiment wurde das Wachstumsverhalten von *wbp1-1* pVT100 und *wbp1-1* pVT100-KEX1-ZZ auf CAA-Medium nach Inkubation für 4 Tage bei 30 °C und 31 °C untersucht. Durch die Überexpression von Kex1p konnte

jedoch kein Wachstumsphänotyp, weder bei 30 °C noch bei 31 °C identifiziert werden (Abb. II.35B). Auch konnte nach Analyse der Überlebensrate kein Effekt nach Überexpression von *KEX1* in *wbp1-1* festgestellt werden (Ergebnis nicht gezeigt).

Aufgrund dieser Resultate wird deutlich, dass Kex1p eine wichtige Rolle in der Signalkaskade des PCD einnimmt. Sie zeigen aber auch, dass diese Protease nicht unmittelbar in den Signalweg eingreift, da ansonsten durch die Überexpression ein signifikanter Effekt bei der Analyse apoptotischer Merkmale zu erwarten gewesen wäre. Ferner scheint Kex1p in der Lage zu sein, ein oder mehrere zu diesem Zeitpunkt noch nicht identifizierte Substrate durch Spaltung zu aktivieren, die für eine korrekte und effiziente Induktion oder Ausführung der Apoptose von Nöten sind.

## II.4 Die Rolle der Autophagozytose im programmierten Zelltod ausgelöst durch einen Defekt in der N-Glykosylierung

### II.4.1 Transkriptionelle Regulation autophagozytotischer Gene in *wbp1-1*

Vor kurzem konnte in zwei Publikationen gezeigt werden, dass Überexpression der Autophagozytoseproteine Atg5p in humanen Zellen (Yousefi *et al.*, 2006) und Atg1p in *Drosophila melanogaster* (Scott *et al.*, 2007) nicht zu Autophagozytose, sondern auch zu Apoptose führte. Nach Induktion von Autophagozytose konnte bis jetzt noch keine Regulation der Autophagozytoseproteine nachgewiesen werden. Eine Ausnahme hierfür stellt *ATG8* dar, dessen Transkription nach Induktion von Autophagozytose durch Kultivierung von Hefezellen in Stickstoff-Minimalmedium (Huang *et al.*, 2000; Kirisako *et al.*, 1999) oder durch Behandlung der Zellen mit Rapamycin (Kirisako *et al.*, 1999) gesteigert wurde. Ebenso konnte nach Überexpression des humanen pro-apoptotischen Faktors Bax, was in *S. cerevisiae* zur Initiierung von Autophagozytose führte, eine Zunahme von Atg8p identifiziert werden (Kissova *et al.*, 2006). Aufgrund dessen wurde in dieser Arbeit mittels Transkriptionsanalyse die Regulation autophagozytotischer Proteine nach Induktion des programmierten Zelltods in *wbp1-1* untersucht.

Wie aus Tabelle II.8 hervorgeht wurden nach Induktion des N-Glykosylierungsdefekts in *wbp1-1* durch einen „Temperaturshift“ von 4 h auf 37 °C im Vergleich zum Wildtyp 20 Autophagozytosegene identifiziert, deren Transkription um das 2 bis 7fache hochreguliert wurde. Auch beim Vergleich von *wbp1-1* bei 37 °C mit *wbp1-1* bei 25 °C wurden 14 der 20 Gene mindestens doppelt so stark exprimiert, vier weitere um das 1,4 bis 2fache. Änderungen, die sich in diesem niedrigen Bereich befinden, sollten durch Wiederholung des Experimentes jedoch überprüft werden. Da dies jedoch im Rahmen der Doktorarbeit nicht möglich war, wurden diejenigen Gene, deren Hochregulation über 1,4 lag, für die Auswertung verwendet. 12 weitere an der Autophagozytose beteiligte Gene wiesen eine Hochregulation zwischen 1,5 und 2 auf. In der Literatur werden für viele autophagozytotischen Gene unterschiedliche Bezeichnungen verwendet. Deshalb wurde in dieser Arbeit die im Jahre 2003 veröffentlichte vereinheitlichte Nomenklatur der „Yeast autophagy-related genes“ (ATG) verwendet (Klionsky *et al.*, 2003). Zusammenfassend wird deutlich, dass alle für die Autophagozytose wichtigen Gene, mit Ausnahme von *ATG12*, nach Induktion des Glykosylierungsdefekts mehr oder weniger stark hochreguliert wurden (Tabelle II.8, Teil 1 und 2).

Gen	Funktion des Genprodukts	wbp1-1 37 °C → WT 37 °C	Veränderung	wbp1-1 37 °C → wbp1-1 25 °C	Veränderung
PRB1	Vakuoläre Proteinase B; involviert in Proteindegradation in der Vakuole	7	I	3,7	I
ATG8	Notwendiges Protein für die Autophagozytose; essentiell für die Bildung von Autophagosomen	5	I	3,5	I
LAP4	Vakuoläre Aminopeptidase, wird in Studien oft als Markerprotein für Autophagozytose und den "cytosol to vacuole targeting (CVT) pathway" verwendet	4,6	I	5,3	I
ATG17	Protein interagiert mit Atg1p (Protein Kinase) und ist für dessen Aktivierung notwendig; ist in Autophagozytose involviert, nicht aber in den Cvt Signalweg	4,3	I	3	I
ATG15	Notwendige Lipase für die intravakuoläre Lyse autophagozytotischer Vesikel; ist in ER-Membranen lokalisiert und wird während der Autophagozytose in intravakuoläre Vesikel transportiert	4,3	I	2,3	I
ATG1	Für Autophagozytose und den Cvt Signalweg benötigte Serin/Threonin Proteinkinase	3,2	I	3,3	I
ATG20	Protein beteiligt am Transport der Aminopeptidase I (Lap4p) über den Cvt Signalweg	3,2	I	3	I
ATG19	Protein ist am Cvt Signalweg und an Autophagozytose beteiligt; erkennt Transportproteine und bringt diese zu pre-autophagosomalen Strukturen, die durch das Autophagosom umschlossen werden können	3	I	1,9	I
ATG31	Protein für die Bildung des Autophagosoms in Zusammenarbeit mit Atg17p notwendig; scheint bei der Organisation von Mikrotubuli eine Rolle zu spielen	2,8	I	2,5	I
ATG7	Autophagozytose-verwandtes Protein; Vermittelt die Bindung von Atg12p mit Atg5p und Atg8p	2,8	I	2,5	I

**Tabelle II.8 (Teil 1): Auflistung von Autophagozytosegenen, die während des programmierten Zelltods ausgelöst durch defekte N-Glykosylierung hochreguliert wurden. Increase (I), Not countable (NC).**

Gen	Funktion des Genprodukts	wbp1-1 37 °C → WT 37 °C	Veränderung	wbp1-1 37 °C → wbp1-1 25 °C	Veränderung
ATG24	Ist an der Rückgewinnung von späten Golgi SNAREs vom post-Golgi Endosom zum trans-Golgi Netzwerk und am Vesikeltransport vom Cytoplasma zur Vakuole beteiligt	2,6	I	2	I
SFB2	Mögliche Komponente von mit COPII-beschichteten Vesikeln, die an Sec23p bindet; spielt beim Vesikeltransport zwischen ER und Golgi und in der Autophagozytose eine Rolle	2,6	I	1,2	I
ATG9	Transmembranprotein, das an der Bildung von Cvt und Autophagozytosevesikel beteiligt ist	2,5	I	3	I
ATG5	Konserviertes, Autophagozytose-verwandtes Protein, das eine Bindung mit Atg12p und Atg16p eingeht, um einen cytosolischen Komplex zu formen, der für die Bildung des Autophagosoms essentiell ist	2,5	I	2	I
ATG14	Untereinheit des Autophagozytose-spezifischen Phosphatidylinositol 3-Kinase Komplexes, der für die Organisation pre-autophagosomaler Strukturen notwendig ist	2,3	I	2,5	I
ATG2	Peripheres Membranprotein, das für die Bildung cytosolischer Vesikel benötigt wird	2,1	I	2,8	I
ATG18	Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphat Bindeprotein der vakuolären Membran, das für die Rückgewinnung von Atg9p durch eine pre-autophagosomale Struktur benötigt wird	2,1	I	1,9	I
ATG4	Für Autophagozytose benötigte Cysteinprotease, die Atg8p in eine Form spaltet, die für die Bildung von Cvt und Autophagosomenvesikel notwendig ist; vermittelt die Anheftung von Autophagosomen an Mikrotubuli durch die Interaktion mit Tub1p und Tub2p	2,1	I	1,7	I
ATG3	Protein ist an Autophagozytose während Nährstoffmangel beteiligt; es spielt eine Rolle bei der Bildung von Atg8p-Phosphatidylethanolamin Konjugaten, die bei der Membrandynamik während der Autophagozytose eine Rolle spielen	2	I	1,6	I
ATG10	Vermittelt die Bindung zwischen Atg12p-Atg5p, was einen wichtigen Schritt in der Autophagozytose darstellt	2	I	1,1	NC

**Tabelle II.8 (Teil 2): Auflistung von Autophagozytosegenen, die während des programmierten Zelltods ausgelöst durch defekte N-Glykosylierung hochreguliert wurden. Increase (I), Not countable (NC).**

### Induktion der Autophagozytose

Signalkaskade der Tor2 und Atg1 Kinase

ATG1, ATG2, ATG3, VPS30/ATG6, ATG9, ATG11, ATG13, ATG14, ATG17, ATG18

Konjugationssystem der Atg Proteine und Bildung der Autophagosomen

ATG5, ATG7, ATG10, ATG16, ATG31, SFB2

### Regulation der Autophagosomengröße

ATG4, ATG8

### Anlagerung an und Fusionierung mit der vakuolären Membran

VAM7, VPS16, VPS34, VPS41, VPS45, VPS51, VPS54

### Degradation der Autophagosomenmembran

ATG15, ATG22

### Vakuoläre Proteasen

LAP4, PRB1

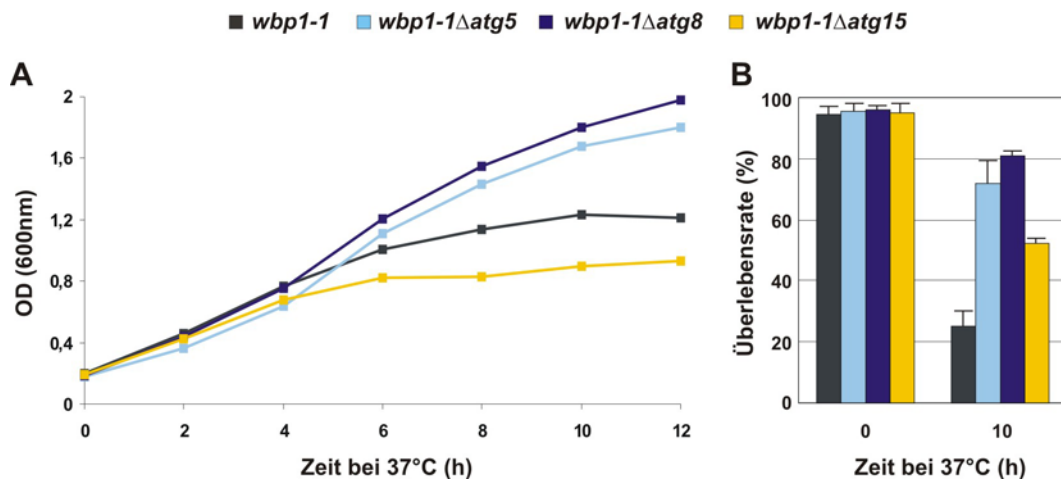
**Tabelle II.9: Einteilung der hochregulierten Gene in verschiedene Funktionsbereiche der autophagozytotischen Signalkaskade (modifiziert nach Klionsky und Emr, 2000).**

Grau hinterlegte Gene wiesen für die Hochregulation in der Transkriptomanalyse einen Wert über 2 auf.

Zur besseren Übersicht wurden diese Gene in verschiedene Bereiche der autophagozytotischen Kaskade unterteilt (Tabelle II.9). Aus drei dieser fünf aufgeführten Sparten wurde je ein Gen ausgewählt, dessen Inaktivierung zur Hemmung von Autophagozytose führt, und für weitere Analysen verwendet: ATG5 aus „Induktion der Autophagozytose“ (Kametaka *et al.*, 1996), ATG8 aus „Regulation der Autophagosomengröße“ (Kirisako *et al.*, 1999) und ATG15 aus „Degradation der Autophagosomenmembran“ (Teter *et al.*, 2001).

## II.4.2 Analyse apoptotischer Marker nach Disruption von Autophagozytosegenen in *wbp1-1*

Die drei genannten Gene wurden in *wbp1-1* mit einer *KAN*-Kassette disruptiert und in einem ersten Versuch das Wachstumsverhalten der Kulturen nach Umsetzen auf die restriktive Temperatur untersucht (Abb. II.36A). Wie schon in Abbildung II.24B nachgewiesen werden konnte, war *wbp1-1* nach etwa 4 h Inkubation bei 37 °C nicht mehr in der Lage sich weiter zu verdoppeln. Dagegen führte die Disruption von *ATG5* und *ATG8* zu einem besseren Wachstumsverhalten der N-Glykosylierungsmutante bei restriktiver Temperatur, so dass auch nach 12 h bei 37 °C immer noch, wenn auch in geringem Maße, Wachstum nachgewiesen werden konnte. Die *ATG15* Disruptante zeigte im Vergleich zu *wbp1-1* nahezu keinen Unterschied im Wachstumsverhalten, auch dieser Stamm stellte die



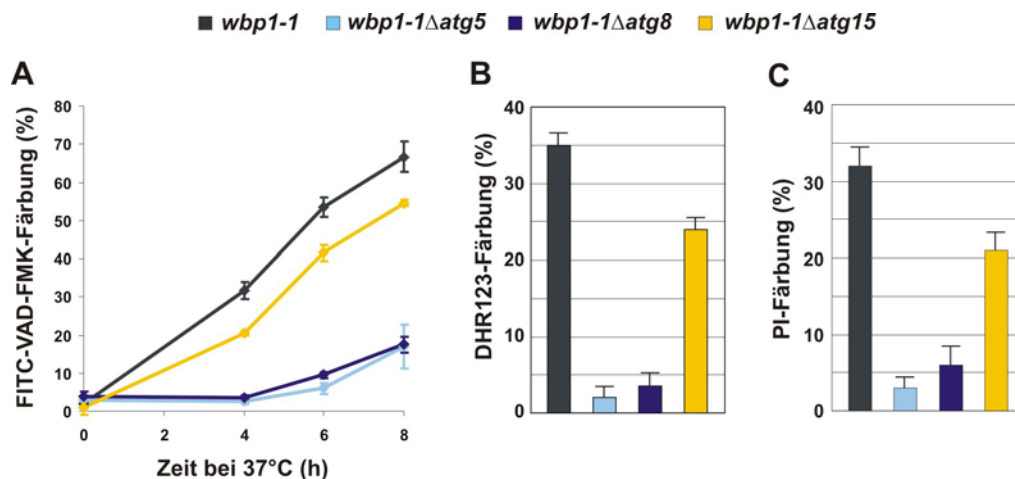
**Abbildung II.36: Wachstumsverhalten von *wbp1-1* und der Autophagozytosedisruptanten.**

A: Die Kulturen wurden über Nacht bei 25 °C in YPD auf eine  $OD_{600}$  von 0,2 angezogen, für 2 bis 12 h bei 37 °C inkubiert und die optische Dichte bei 600 nm untersucht.

B: Analyse der Überlebensrate nach 10 h Inkubation bei restriktiver Temperatur. Einzelzellen wurden mit dem MoFlo Zellsorter direkt auf YPD-Platten sortiert, für 3-4 Tage bei 25 °C inkubiert und anschließend die Zahl der gewachsenen Zellen detektiert.

Zellteilung nach 4-6 h bei 37 °C ein. Des Weiteren wurde die Überlebensrate der Stämme nach Inkubation für 10 h bei restriktiver Temperatur analysiert. Auch hier verbesserte sich durch das Fehlen der für die Autophagozytose benötigten Proteine Atg5 und Atg8 die Überlebensrate der *wbp1-1* Mutante von 25% auf 72% ( $\Delta atg5$ ) bzw. 81% ( $\Delta atg8$ ) (Abb. II.36B). Obwohl es nach Disruption von *ATG15* zu keinem deutlich verlängerten Wachstum bei restriktiver Temperatur kam, verbesserte sich die Überlebensrate der Zellen von 25% auf 52%. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden nachfolgend Caspaseaktivität, die Ansammlung reaktiver Sauerstoffspezies und die Färbung der Zellen mit PI untersucht. Die *wbp1-1* Mutante zeigte nach 4 h bei restriktiver Temperatur 32%, nach 6 h 53% und nach 8 h 67% Caspaseaktivität (Abb. II.37A). Die Disruption der in der autophagozytotischen Kaskade beteiligten Gene *ATG5* und *ATG8* hatte eine starke Abnahme der Proteaseaktivität zur Folge. Nach 4 h bei 37 °C konnten nur 3% bzw. 4%, nach 6 h 6% bzw. 9% und nach 8 h für beide

Stämme 17% Caspase-positive Zellen identifiziert werden. Dagegen wurde Caspaseaktivität in *Atg15* an den gemessenen Zeitpunkten nur um etwa 10% reduziert, was im Einklang mit den nach Analyse der Überlebensrate erhaltenen Ergebnissen steht (Abb. II.36B). In *Atg5* und *Atg8* kam es auch zu einer Verminderung der ROS-Produktion nach Inkubation der Kulturen für 4 h bei 37 °C. Im Vergleich zu *wbp1-1* (35%) wurde die ROS-Akkumulation in *Atg5* auf 2%, in *Atg8* auf 4% reduziert, wohingegen 24% der Zellen der *ATG15* Disruptante ein positives Signal für das Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies aufwiesen. Ein ähnliches Resultat wurde nach Färbung der Zellen mit PI



**Abbildung II.37: Durchflußzytometrische Untersuchung von Caspaseaktivität, ROS-Produktion und PI-Färbung von *wbp1-1* und den Autophagozytosedisruptanten.**

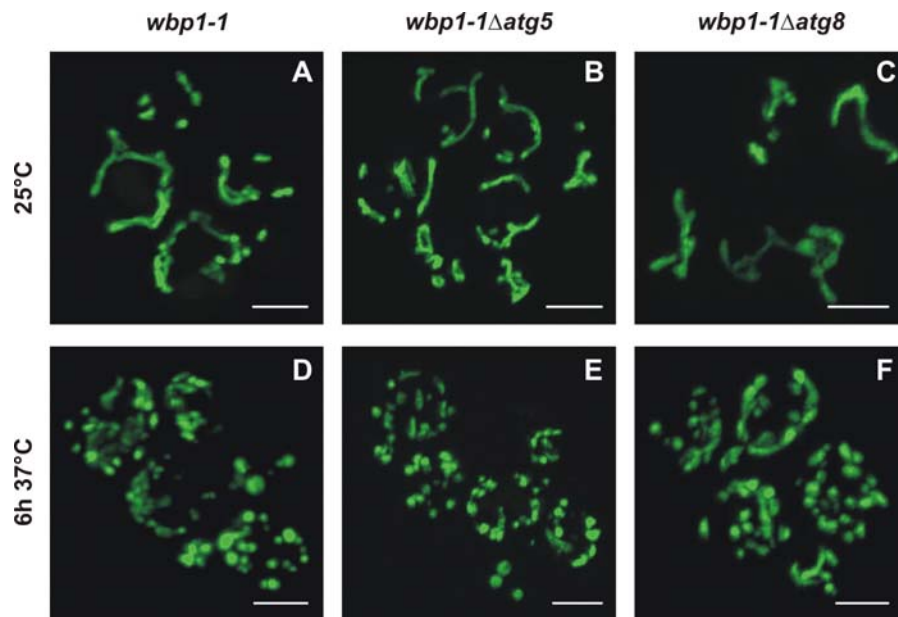
A: Analyse von Caspaseaktivität nach Inkubation der Kulturen für 4 bis 8 h bei 37 °C und Färbung der Zellen mit FITC-VAD-FMK.

ROS-Akkumulation (B) und PI-Färbung (C) der Kulturen nach 4 h Inkubation bei restriktiver Temperatur.

erhalten. Die Disruptionen der Autophagozytosegene verminderten die Anzahl an post-apoptotischen Zellen in *wbp1-1* von 32% auf 3% (*Δatg5*), 6% (*Δatg8*) und 21% (*Δatg15*).

Ein weiteres wichtiges Merkmal für eine Induktion des programmierten Zelltods stellt die Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks dar. Um sicherzustellen, dass es sich bei dem beobachteten Phänotyp (siehe Abb. II.5) tatsächlich um eine Fragmentierung der Mitochondrien und nicht um einen autophagozytotischen Abbau dieser in der Vakuole handelte (so genannte „mitophagy“, siehe I.2), wurde die Mitochondrienmorphologie in *wbp1-1Δatg5* und *wbp1-1Δatg8* untersucht, in denen die Autophagozytose durch Disruption der Gene gestört war. Aus Abbildung II.38A-C wird ersichtlich, dass die Disruption von *ATG5* und *ATG8* in *wbp1-1* zu keiner Veränderung der Mitochondrienmorphologie im Vergleich zu *wbp1-1* im Falle einer Inkubationstemperatur von 25 °C führten. Auch nach Induktion von ER-Stress durch Inkubation der Kulturen bei restriktiver Temperatur für 6 h konnte in *wbp1-1Δatg5* und *wbp1-1Δatg8* keine Veränderung der Mitochondrienfragmentierung nachgewiesen werden (Abb. II.38D-F).



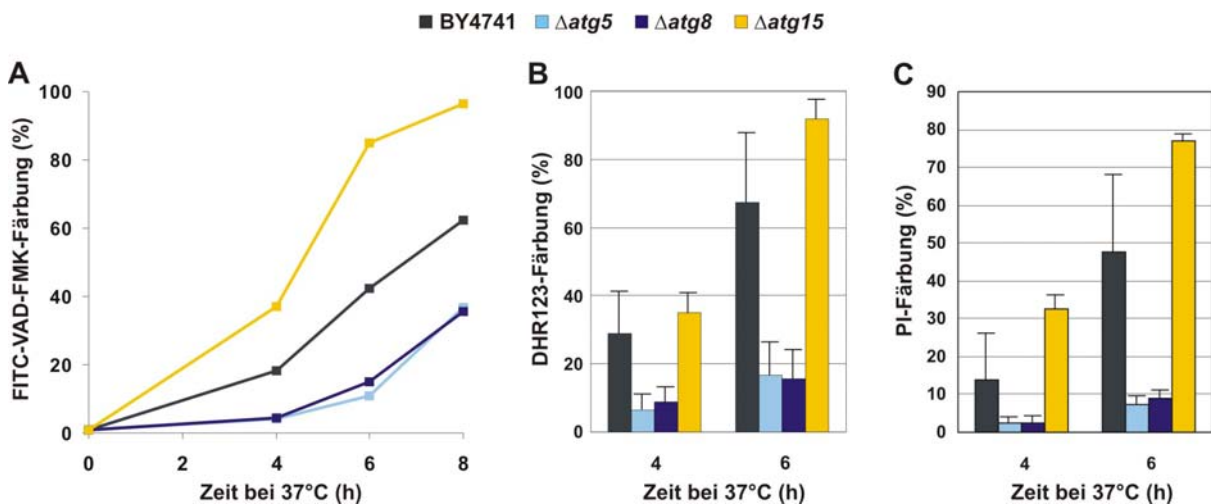


**Abbildung II.38:** Analyse der Mitochondrienmorphologie in *wbp1-1*,  $\Delta atg5$  und  $\Delta atg8$  nach Inkubation der Kulturen für 6 h bei 37 °C. Die Balken entsprechen 5 μm.

Dies beweist, dass es sich bei der in Abschnitt II.1.1.3 beschriebenen Veränderung der Mitochondrien tatsächlich um eine Fragmentierung dieser handelte, die durch die Induktion der Signalkaskade des programmierten Zelltod ausgelöst worden war.

### II.4.3 Untersuchung apoptotischer Phänotypen nach Deletion von Autophagozytosegenen im Wildtyp

Aufgrund der zum Teil sehr deutlichen Effekte in den *ATG* Disruptanten bezüglich Caspaseaktivität, ROS-Akkumulation, PI-Färbung und Überlebensrate wurde untersucht, inwieweit sich ein stärkerer als in der *wbp1-1* Mutante auftretender N-Glykosylierungsdefekt auf den Wildtypstamm BY4741 nach Disruption autophagozytotischer Gene auswirkt. Dafür wurden der Wildtyp BY4741 und die entsprechenden *ATG* Disruptanten aus der Euroscarf Deletionsgenbank mit dem N-Glykosylierungshemmstoff Tunicamycin bei 37 °C inkubiert. Auch hier kam es zu einer Verminderung an Caspaseaktivität in den *atg5* und *atg8* Mutanten nach 8 h bei restriktiver Temperatur von 62% (BY4741) auf 30% ( $\Delta atg5$ ) bzw. 35% ( $\Delta atg8$ ) (Abb. II.39A). Überraschenderweise führte die Behandlung von BY4741 $\Delta atg15$  mit Tunicamycin zu einem starken Anstieg Caspase-positiver Zellen von 42% auf



**Abbildung II.39: Analyse apoptotischer Merkmale in BY4741 und den Autophagozytosedisruptanten nach Behandlung der Kulturen mit 10 µg/ml Tunicamycin.**

A: Detektion von Caspaseaktivität nach Inkubation der Kulturen für 4 bis 8 h bei 37 °C und Färbung der Zellen mit FITC-VAD-FMK. Aufgrund der sich überschneidenden Standardabweichungen wurden diese zugunsten der besseren Übersicht weggelassen.

B: Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies nach Inkubation der Kulturen für 4 und 6 h bei restriktiver Temperatur. ROS wurden durch Inkubation der Kulturen mit DHR123 nachgewiesen.

C: Lebend-Tot-Färbung der Zellen mit PI nach Inkubation für 4 und 6 h bei 37 °C.

85% nach 6 h und von 62% auf 96% nach 8 h Inkubation. Analoge Resultate wurden nach Analyse der ROS-Produktion und PI-Färbung der Zellen erhalten. Sowohl nach 4 h als auch nach 6 h zeigten nur 6% und 16% ( $\Delta atg5$ ) bzw. 9% und 15% ( $\Delta atg8$ ) der Zellen Färbung mit Rhodamin 123 im Vergleich zum Wildtyp BY4741 (29% und 76%) (Abb. II.39B). In  $\Delta atg15$  konnte wiederum eine ansteigende Menge an Zellen identifiziert werden (35% und 92% nach 4 h und 6 h bei 37 °C), die ROS-positiv waren. Die Disruption von *ATG5* und *ATG8* verzögerte außerdem den Verlust der Membranintegrität in mit TM behandelten Zellen. Im Vergleich zu BY4741, der nach 4 h 14% und nach 6 h 48% post-

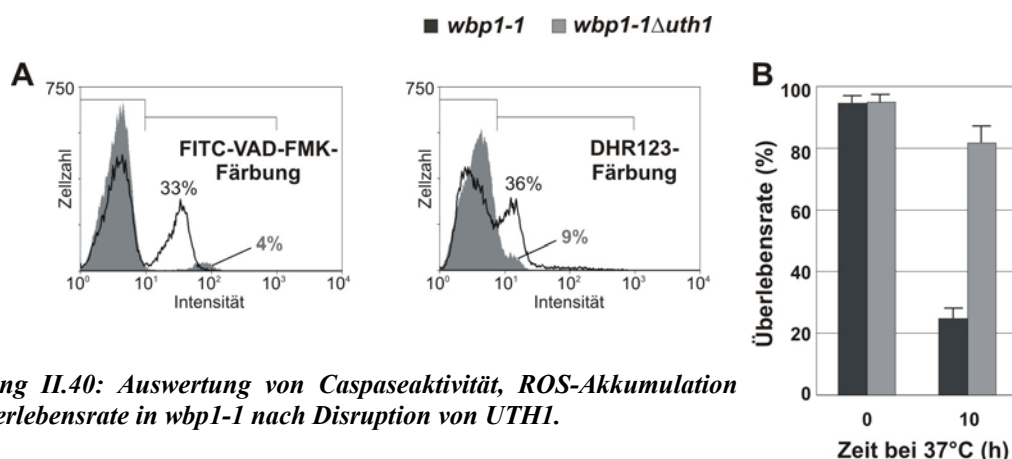
apoptotische Zellen enthielt, waren in *Δatg5* nur 2% und 7% bzw. in *Δatg8* nur 2% und 9% PI-positiv (Abb. II.39C). Im Gegensatz zu *Δatg5* und *Δatg8* aber in Übereinstimmung mit Caspaseaktivität und ROS-Akkumulation nahm die Anzahl gefärbter Zellen in *Δatg15* auf 33% (4 h) und 77% (6 h) zu.

Bis heute konnten mehr als 20 *ATG* Gene in *S. cerevisiae* identifiziert werden, die an der korrekten Durchführung der Autophagozytose beteiligt sind (Levine und Klionsky, 2004) und viele dieser Gene besitzen Homologe in Höheren Eukaryoten (zusammengefasst in Klionsky *et al.*, 2003). Zur näheren Charakterisierung wurden *ATG* Disruptanten unter anderem in stickstofffreiem Medium inkubiert, was zur Induktion von Autophagozytose führt. Hierbei wurde beobachtet, dass die Disruption von *ATG5*, *ATG8* oder *ATG15* eine Reduktion der Lebensfähigkeit und Überlebensrate bewirkt (Kametaka *et al.*, 1996; Lang *et al.*, 1998; Teter *et al.*, 2001). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass durch die Hemmung der Autophagozytose die Versorgung der Zellen mit Stickstoff, den sie durch Abbau und Recycling nicht mehr benötigter Bestandteile der Zelle zurückgewinnen (Kohda *et al.*, 2007), nicht mehr gewährleistet ist und zum Absterben führt. Im Gegensatz dazu wurde durch Disruption von *ATG5*, *ATG8* oder *ATG15* in *wbp1-1* eine Steigerung der Überlebensrate nachgewiesen (Abb. II.36B). Ebenso wurden Caspaseaktivität, ROS-Akkumulation und die Anzahl an toten Zellen nicht nur in der N-Glykosylierungsmutante *wbp1-1* (Abb. II.37A-C), sondern auch nach Behandlung von Wildtypzellen mit dem N-Glykosylierungshemmstoff Tunicamycin, reduziert (ausgenommen *Δatg15*) (Abb. II.39A-C). Da die Zellen im Gegensatz zum Wachstum in stickstofffreiem Medium keine fehlenden Nährstoffe durch Autophagozytose bereitstellen mussten, stellte sich die Frage, wieso die Transkription autophagozytotischer Gene in *wbp1-1* in so großem Maße gefördert wurde. Eine Antwort darauf könnte eine mögliche Beteiligung von Autophagozytosegenen bei der Initiierung des programmierten Zelltods sein, wie es kürzlich in *Drosophila melanogaster* und in Säugerzellen nachgewiesen werden konnte (Scott *et al.*, 2007; Yousefi *et al.*, 2006). Es wurde gezeigt, dass Atg5p durch Calpain, eine Cysteinprotease, gespalten und die entstandene verkürzte Form (tAtg5p, truncated form of Atg5p) vom Cytosol zur Mitochondrienmembran transportiert wird. Dort bindet sie an den anti-apoptotischen Faktor *Bcl-x<sub>L</sub>*, der dadurch möglicherweise seine anti-apoptotische Wirkung verliert, die auf der Bindung pro-apoptotischer Moleküle, wie Bax und Bak, beruht. Die Translokation von tAtg5p zum Mitochondrium führte zur Freisetzung von Cytochrom *c* und möglicherweise weiterer pro-apoptotischer Moleküle aus dem mitochondriellen Intermembranbereich ins Cytosol, wo es dadurch unter anderem zur Aktivierung der Effektorcaspase-3 kam (Yousefi *et al.*, 2006). Des Weiteren konnte von Scott und seiner Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Überexpression der Proteinkinase Atg1 in *Drosophila* Autophagozytose induzierte, was zu einem starken Absterben dieser Zellen nach Aktivierung der Caspase-3 und zu DNA-Fragmentierung führte (Scott *et al.*, 2007). Beide Arbeiten machen deutlich, dass durch erhöhte Expression von Atg5p oder Atg1p nicht nur Autophagozytose, sondern auch ein mit apoptotischen Phänotypen einhergehender programmierter Zelltod induziert werden konnte. Dies steht im Einklang mit den unter II.4.1 dargelegten Resultaten.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Induktion des N-Glykosylierungsdefekts in *wbp1-1* zu einem Expressionsanstieg autophagozytischer Proteine (Tab. II.8) und zum programmierten Absterben der Zellen führte, wobei diese apoptotische Merkmale wie Caspaseaktivität und ROS-Akkumulation aufwiesen. Dagegen wurde nach Disruption von *ATG5* und *ATG8* in *wbp1-1* (nach „Temperaturshift“) und Wildtyp (nach Behandlung mit TM) eine Abnahme von Caspaseaktivität, ROS-Akkumulation und Anzahl an toten Zellen, was mit einer verbesserten Überlebensrate vereinbar ist (nur für den *wbp1-1* Hintergrund gezeigt), nachgewiesen (Abb. II.36, II.37 und II.39). Es scheint, dass nicht nur in Höheren Eukaryoten, sondern auch in *S. cerevisiae* Autophagozytoseproteine eine wichtige Rolle, direkt oder indirekt, bei PCD aufgrund defekter Protein-N-Glykosylierung spielen.

## II.4.4 Auswirkung der Disruption von *UTH1* auf Phänotypen des programmierten Zelltods

Nachdem vor kurzem *UTH1* („youth“) eine Verbindung mit autophagozytischer Degradation von Mitochondrien zugeordnet werden konnte (Kissova *et al.*, 2004), sollte auch hier analysiert werden, inwieweit Uth1p bei der Fragmentierung der Mitochondrien, ausgelöst durch PCD, involviert ist. Uth1p, das durch eine Transmembrandomäne in der äußeren Mitochondrienmembran verankert ist, war ursprünglich in Mutantenscreens im Zusammenhang mit oxidativem Stress (Bandara *et al.*, 1998) und Verlängerung der Lebensspanne (Kennedy *et al.*, 1995) identifiziert worden. Wegen dieser Befunde sollte *UTH1* in *wbp1-1* disruptiert werden und anschließend apoptotische Phänotypen und Überlebensraten untersucht werden. In Abbildung II.40A ist die durchflußzytometrische Analyse von Caspaseaktivität (links) und ROS-Akkumulation (rechts) in *wbp1-1* und *wbp1-1Δuth1* dargestellt. Die



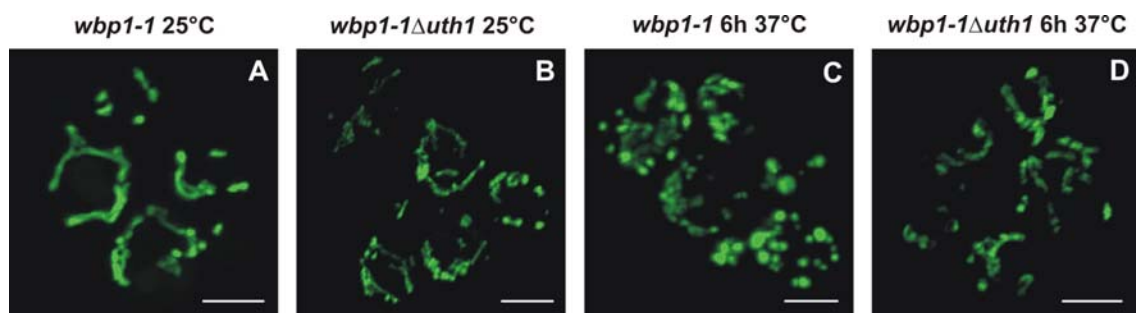
**Abbildung II.40: Auswertung von Caspaseaktivität, ROS-Akkumulation und Überlebensrate in *wbp1-1* nach Disruption von *UTH1*.**

A: Durchflußzytometrische Analyse der Caspaseaktivität nach Färbung der Zellen mit FITC-VAD-FMK (links) und ROS-Produktion nach Inkubation der Zellen mit DHR123 (rechts). Die Kulturen wurden für 4 h bei restriktiver Temperatur inkubiert.

B: FACS-Analyse der Überlebensrate beider Stämme nach Inkubation der Kulturen für 10 h bei 37 °C. Einzelzellen wurden mit dem MoFlo Zellsorter auf YPD-Platten sortiert, diese für 3-4 Tage bei 25 °C inkubiert und die Anzahl an gewachsenen Kolonien detektiert.

Eliminierung von Uth1p verursachte einen starken Rückgang der Caspaseaktivität von 33% auf 4% (links) und der ROS-Produktion von 36% auf 9% (rechts) nach Inkubation der Kulturen für 4 h bei restriktiver Temperatur. Gleichzeitig erhöhte sich die Überlebensrate von *wbp1-1Δuth1* nach Inkubation für 10 h bei 37 °C von 25% auf 81% (Abb. II.40B).

Wie oben bereits angesprochen, spielt Uth1p bei der autophagozytotischen Degradation von Mitochondrien eine wichtige Rolle. Aufgrund dieser Tatsache wurde im folgenden Experiment die Mitochondrienmorphologie der *wbp1-1* Mutante, für die Mitochondrienfragmentierung nach Induktion des N-Glykosylierungsdefekts durch Inkubation der Zellen bei restriktiver Temperatur nachgewiesen werden konnte (Abb. II.5), und *wbp1-1Δuth1* miteinander verglichen. In beiden Stämmen konnten bei einer Inkubationstemperatur von 25 °C Mitochondrien nachgewiesen werden, die in tubulären Strukturen miteinander verbunden waren (Abb. II.41A und B). Nach Inkubation bei 37 °C für 6 h wiesen die Mitochondrien in *wbp1-1* eine starke Fragmentierung auf (Abb. II.41C), die durch

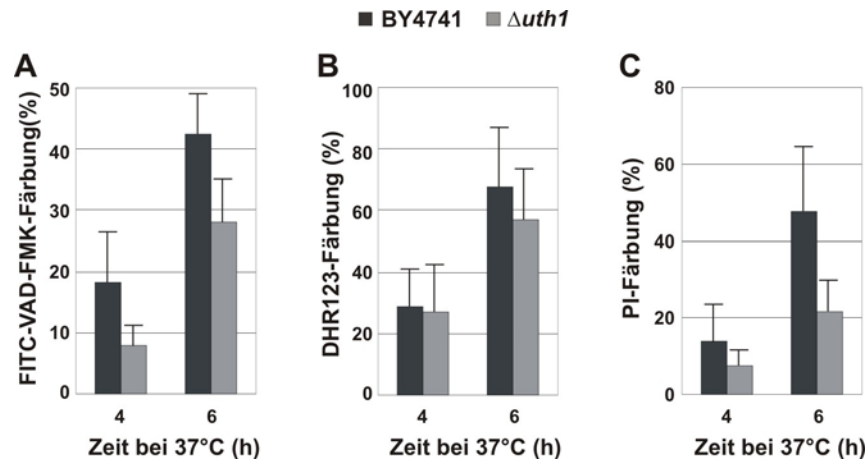


**Abbildung II.41:** Disruption von *UTH1* in *wbp1-1* führt zu keiner Veränderung der Mitochondrienmorphologie nach Inkubation der Kulturen bei restriktiver Temperatur.

Disruption von *UTH1* stark reduziert werden konnte (Abb. II.41D). Somit scheint Uth1p eine sehr wichtige Aufgabe nicht nur bei der in der Literatur beschriebenen autophagozytotischen Degradation der Mitochondrien (Kissova *et al.*, 2004), sondern wie hier gezeigt auch bei deren Fragmentierung nach Induktion des programmierten Zelltods zuzukommen.

Aufgrund dieser Resultate wurden die Analysen auf den Wildtypstamm BY4741 und die aus der Euroscarf Deletionengenbank stammenden *uth1* Mutante ausgedehnt. Nach Inkubation der Kulturen für 4 und 6 h bei 37 °C und Hemmung der N-Glykosylierung durch Tunicamycin konnte eine Reduktion der Caspaseaktivität von 18% auf 8% (4 h) und von 42% auf 28% (6 h) in *Δuth1* identifiziert werden (Abb. II.42A). Ebenso verminderte sich die Anzahl PI-positiver Zellen von 14% auf 7% (4 h) und von 48% auf 22% (6 h) (Abb. II.42C). Erstaunlicherweise reduzierte sich die Ansammlung reaktiver Sauerstoffspezies in *Δuth1* nicht bzw. nur in geringem Maße (nach 4 h von 29% auf 27% und nach 6 h von 67% auf 57%). Dies kann bislang noch nicht erklärt werden (Abb. II.42B).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Deletion von *UTH1* eine Inhibition der Mitochondrienfragmentierung sowie eine Unterdrückung der apoptotischen Phänotypen bei



**Abbildung II.42: Analyse apoptotischer Marker im Wildtyp BY4741 und  $\Delta$ uth1 nach Inkubation der Kulturen mit 10  $\mu$ g/ml Tunicamycin.**

Die Kulturen wurden für 4 und 6 h bei 37 °C mit TM inkubiert und anschließend Caspaseaktivität nach Färbung der Zellen mit FITC-VAD-FMK (A), ROS-Akkumulation nach Inkubation der Kulturen mit DHR123 (B) und tote Zellen nach PI-Färbung (C) identifiziert.

gleichzeitiger Verbesserung der Überlebensrate bewirkte. Dies spricht zweifelsfrei für eine Beteiligung der Mitochondrien an dieser Signalkaskade.

## II.5 „Unfolded Protein Response“ und Apoptose

Der „Unfolded Protein Response“ (UPR) stellt einen intrazellulären Signalweg dar, der durch die Anreicherung falsch gefalteter Proteine im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) aktiviert wird. Nachdem in *S. cerevisiae* erste Komponenten dieses Signalwegs in den 90er Jahren identifiziert werden konnten, wurden viele Homologe auch in Höheren Eukaryoten bis hin zum Menschen identifiziert, was auf eine wichtige Funktion innerhalb der Zelle hinweist. Im Folgenden wurden die durch den UPR hochregulierten Gene und apoptotische Marker in UPR defizienten Mutanten analysiert.

### II.5.1 Genregulation durch den UPR

Es wurde gezeigt, dass die Induktion des UPR in *S. cerevisiae* durch Behandlung der Kulturen mit verschiedenen chemischen Agenzien ausgelöst werden kann. Darunter fallen Tunicamycin, das den ersten Schritt der Glykoproteinsynthese (UDP-N-Acetylglukosamin + Dolicholphosphat → Dolicholpyrophosphat-N-Acetylglukosamin) und somit die Bildung aller N-Glykanketten hemmt, sowie DTT, das die Ausbildung von Disulfidbrücken im ER-Lumen unterbindet (Patil und Walter, 2001). In einer genetischen Studie wurden knapp 400 Gene identifiziert, die durch Induktion des UPR mittels Tunicamycin und DTT hochreguliert wurden (Travers *et al.*, 2000). Um UPR regulierte Gene in der *wbp1-1* Mutante zu identifizieren, wurde eine Transkriptomanalyse durchgeführt und mit den der oben genannten Arbeit verglichen. Hierzu wurden die Zellen für 4 h auf die restriktive Temperatur „geschiftet“ und die daraus gewonnene mRNA analysiert. Zu diesem Zeitpunkt tritt bereits verstärkte Unterglykosylierung auf. Viele der in *wbp1-1* hochregulierten Gene sind in den sekretorischen Signalweg involviert und werden deshalb in Tabelle II.10 in folgende funktionelle Kategorien unterteilt: Proteinmodifikation, -faltung, -degradation, Vesikeltransport und Lipidstoffwechsel. Von den 55 aufgelisteten Genen waren 23 Gene (grau hinterlegt) nicht nur nach Induktion des UPR in der *wbp1-1* Mutante, sondern auch nach Induktion des UPR mittels TM und DTT hochreguliert worden (Travers *et al.*, 2000). Die relativ hohe Anzahl an gleich regulierten Genen spricht erstens für die erwartete Induktion des UPR in der *wbp1-1* Mutante und zweitens für eine wichtige Funktion dieser Gene in der Signalkaskade. Acht der hochregulierten Gene kodieren für Proteine, die für Proteinmodifikationen wie N-Glykosylierung, GPI-Ankersynthese und O-Glykosylierung im Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat bedeutend sind. Die Zelle scheint offensichtlich zu versuchen, auftretende Faltungsdefekte in der *wbp1-1* Mutante zu kompensieren. Da dies durch den anhaltenden Glykosylierungsdefekt in *wbp1-1* nicht erreicht werden konnte, kommt es zur Ansammlung ungefalteter Proteine. Wie aus der Literatur bekannt, resultiert dieser ER-Stress in der Dissoziation des für die Kontrolle der Proteinfaltung im ER wichtigen Chaperons Kar2p vom



### Proteinmodifikation im ER/Golgi

N-Glykosylierung	<i>MNN4</i> , <i>OCH1</i> , <i>SEC59</i>
GPI-Anker Synthese	<i>GWT1</i> , <i>MCD4</i>
O-Glykosylierung	<i>PMT1</i> , <i>PMT3</i> , <i>PMT5</i>

### Proteinfaltung

Chaperone	<i>ERJ5</i> , <i>JEM1</i> , <i>LHS1</i> , <i>SCJ1</i> , <i>SIL1</i>
Bildung der Disulfidbrücke	<i>ERO1</i> , <i>EUG1</i> , <i>FMO1</i> , <i>MPD1</i> , <i>MPD2</i>

### Proteindegradation

ERAD	<i>DER1</i> , <i>HRD1</i> , <i>HRD3</i> , <i>SEL1</i> , <i>UBC7</i> , <i>USA1</i>
Ubiquitinilierung/Proteasom	<i>DOA4</i> , <i>SAF1</i> , <i>UBC5</i> , <i>UBI4</i> , <i>UBP5</i> , <i>UBP15</i>

### Vesikeltransport ER-Golgi/Vakuoläre und endosomale Proteinsortierung

ER-Golgi	<i>BET4</i> , <i>EMP46</i> , <i>KRE11</i> , <i>SFB2</i> , <i>YPT35</i>
Golgi-Endosom/Vakuole	<i>ARK1</i> , <i>MST27</i> , <i>PEP12</i> , <i>RAV1</i> , <i>RCR2</i> , <i>SHE4</i> , <i>SSH4</i> , <i>VPS62</i> , <i>VPS73</i> , <i>YPT53</i>
Retrograder Transport	<i>BTN2</i> , <i>SNX4</i> , <i>SNX41</i>

### Lipidstoffwechsel

<i>CSH1</i> , <i>GPT2</i> , <i>HEM15</i> , <i>LPP1</i> , <i>SCS3</i> , <i>YKL091C</i> , <i>YJR107W</i>
--

**Tabelle II.10: Auflistung der Gene des sekretorischen Signalwegs, die durch Induktion des UPR hochreguliert wurden.**

Grau hinterlegte Gene wurden ebenso nach Induktion des UPR mittels TM und DTT hochreguliert (Travers *et al.*, 2000). Alle Gene wurden mindestens um das 2fache hochreguliert.

Transmembranprotein Ire1p (Okamura *et al.*, 2000), wodurch dessen Endoribonukleaseaktivität durch Oligomerisation und Autophosphorylierung aktiviert wurde. Mittels der auf der cytosolischen Seite vorhandenen Endoribonukleaseaktivität wird das bis jetzt einzige bekannte Ire1p Substrat, die mRNA des Transkriptionsfaktors *HAC1*, durch Herausschneiden eines Introns aktiviert. Diese gespleisste mRNA wird im Vergleich zur ungespleissten Form viel stärker translatiert. Der aktive Transkriptionsfaktor wird in den Nukleus transloziert, wo er an so genannte „unfolded protein response element“ (UPRE) bindet, was zur Expression vieler für den UPR benötigter Proteine führt. Eine dieser Gengruppen, deren Transkription durch Bindung von Hac1p induziert wurde, kodiert für Chaperone, die an der Faltung von Proteinen beteiligt sind. Das prominenteste Mitglied der HSP70 Familie der molekularen Chaperone, Kar2p, ist nicht nur wie oben angesprochen mit Ire1p assoziiert, sondern kann außerdem im Lumen des ERs an Membranproteine und Proteine des sekretorischen Signalwegs binden, um deren korrekte Faltung zu gewährleisten (Normington *et al.*, 1989; Rose *et al.*, 1989). Diese Substratbindung scheint ATP abhängig reguliert zu werden, wofür vier Gene notwendig sind, für die im Gegensatz zu Kar2p in dieser Transkriptomanalyse eine Hochregulation nachgewiesen werden konnte: *JEM1*, *LHS1*, *SCJ1* und *SIL1*. Ebenso wurde die Expression des Chaperons Erj5p, das

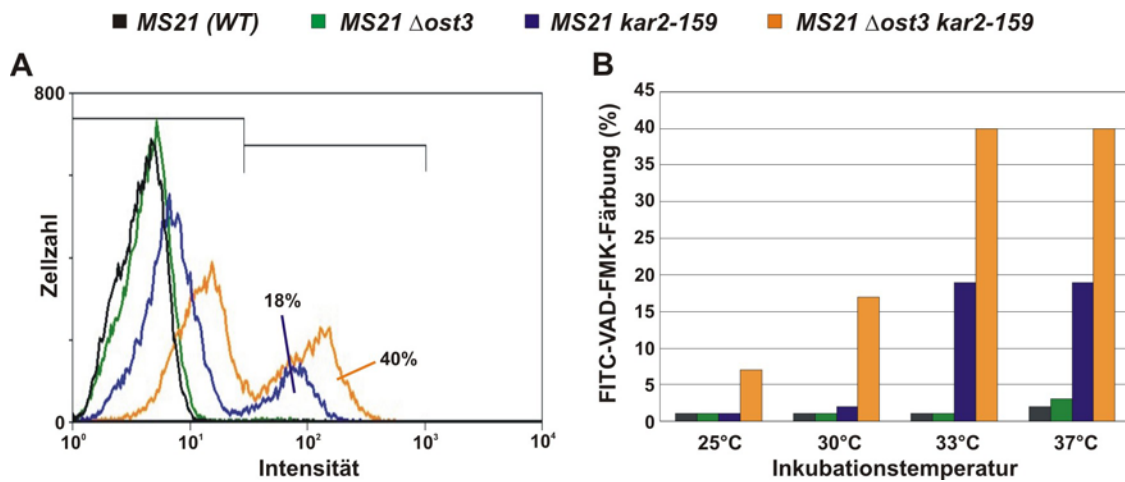


für die Erhaltung der Faltungskapazität im Endoplasmatischen Retikulum wichtig ist, erhöht. Eine weitere Gruppe von Proteinen, die an der Ausbildung von Disulfidbrücken und somit an Proteinfaltungsprozessen beteiligt sind, wurden verstärkt exprimiert, Ero1p, Eug1p, Fmo1p, Mpd1p und Mpd2p, wobei drei dieser Gene der Familie der Proteindisulfidisomerasen zugeordnet werden konnten.

K. Travers und seine Mitarbeiter konnten ebenso nachweisen, dass Tunicamycin neben dem UPR auch die „**ER-associated degradation**“ (ERAD) induziert (Travers *et al.*, 2000). ERAD bezeichnet den Transport missgefalteter, mit Ubiquitin markierter Proteine vom ER vor allem ins Cytosol und deren anschließende Degradation im Proteasom. Auch in *wbp1-1* konnte durch die Akkumulation ungefalteter Proteine nach Induktion des UPR eine Hochregulation von Komponenten des ERAD, wie Der1p, Hrd1p, Hrd3p, und Ubc7p nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden sechs Gene in der Transkriptomanalyse identifiziert, die für die Bereitstellung von Ubiquitin oder dessen Anheftung an abzubauen Proteine benötigt werden. Eine weitere Möglichkeit sich der falsch gefalteten Proteine zu entledigen, stellt der Abtransport dieser über den sekretorischen Signalweg über den Golgi-Apparat in die Vakuole dar. Im Lumen der Vakuole werden die Proteine in die Grundbausteine der Zelle zerlegt und können anschließend wieder dem Stoffwechsel zugeführt werden. Dies scheint tatsächlich der Fall zu sein, da der Vesikeltransport eindeutig in Richtung Vakuole und Endosom verschoben ist, wie die Anzahl der hochregulierten Gene (15) im Vergleich zum retrograden Transport (3) zeigt. Auch scheint die Zelle durch verstärkte Expression von Lipiden, vor allem Phospholipiden, zu versuchen, das Volumen des ERs durch die Bildung neuer Membranen zu vergrößern, um die Konzentration falsch gefalteter Proteine im ER-Lumen zu reduzieren (Travers *et al.*, 2000).

## **II.5.2 Auswirkungen eines nicht funktionellen Kar2p auf Defekte in der N-Glykosylierung**

Das der HSP70 Familie zugehörige molekulare Chaperon Kar2p ist, wie oben erwähnt, an der Kontrolle der Proteinfaltung durch Bindung an Vorstufen von sekretorischen Proteinen und Membranproteinen im ER und an der Induktion des UPR durch Dissoziation von Ire1p beteiligt (Kimata *et al.*, 2003; Normington *et al.*, 1989). Da es sich bei *KAR2* um ein essentielles Gen handelt, wurde in den nachfolgenden Experimenten die *kar2-159* Mutante verwendet, in der ein Basenaustausch von Glycin nach Serin an der Position 417 vorliegt, was zu einem temperatursensitiven Phänotyp führt (Rose *et al.*, 1989). Diese Punktmutation in der ATPase Domäne von *KAR2* vermindert die Affinität zu ATP sehr stark, was in HSP70 Chaperonen dazu führt, dass diese das gebundene Substrat nicht mehr ablösen können (Brodsky *et al.*, 1995; Kimata *et al.*, 2003). Somit hat der Defekt in *kar2-159* zur Folge, dass Kar2p von seinem Substrat Ire1p nicht mehr abdissoziiert und dadurch die Aktivierung von Ire1p durch Oligomerisation und Autophosphorylierung ausbleibt, was letztendlich zur Hemmung des UPR führt. Die Auswirkungen einer defekten N-Glykosylierung auf diese Mutante konnte nicht mittels *wbp1-1* untersucht werden, da diese selbst temperatursensitiv ist. Deshalb wurde sich einer weiteren OST-Mutante bedient, *Δost3*. Disruption von *OST3* verursacht im Wildtyp eine leichte Unterglykosylierung mehrerer untersuchter N-glykosylierter Proteine, hat jedoch keinen Einfluss auf das Wachstum der Mutante bei 37°C (Knauer und Lehle, 1999). Durch zusätzliche Mutation von *kar2-159* in *Δost3* wird die Unterglykosylierung der CPY verstärkt, wohingegen die CPY in der Einfachmutante *kar2-159* nur in der maturen Form vorkommt (Friedrich, 1997). Die Temperatursensitivität der Stämme wurde mittels eines Wachstumstests analysiert. Im Gegensatz zum korrespondierenden Wildtyp sind *kar2-159* und *Δost3kar2-159* nicht mehr in der Lage bei 34 °C zu wachsen. Auch bei 25 °C und 30 °C zeigt die Doppelmutante ein stark vermindertes Wachstumsverhalten, während *kar2-159* ähnliches Wachstum wie der Wildtyp aufweist (Friedrich, 1997). Aufgrund der oben aufgeführten Befunde wurde Caspaseaktivität in den genannten Stämmen untersucht. Schon bei 25 °C kam es in *Δost3kar2-159* zu einer geringen Induktion des programmierten Zelltods, da vermutlich eine Hochregulation von Chaperonen durch die feste Assoziation von Kar2-159p mit Ire1p nicht möglich war (Abb. II.43B). Durch Erhöhung der Inkubationstemperatur stieg die Caspaseaktivität in der Doppelmutante von 7% (25 °C) auf 17% (30 °C) und 40% (33 °C), wobei eine weitere Temperaturerhöhung über 33 °C in keiner zunehmenden Caspaseaktivität resultierte. Auch in *kar2-159* zeigten 27% (33 °C) und 28% (37 °C) der Zellen eine positive Färbung mit FITC-VAD-FMK, was mit einer durch Temperaturstress ausgelösten zunehmenden Missfaltung der Proteine und einem nicht funktionellem UPR erklärt werden könnte (Kimata *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu konnte der in *Δost3* durch Temperaturstress induzierte N-Glykosylierungsdefekt offensichtlich durch intakten UPR so stark reduziert werden, dass keine Aktivierung der Caspasen stattfand (Abb. II.43).

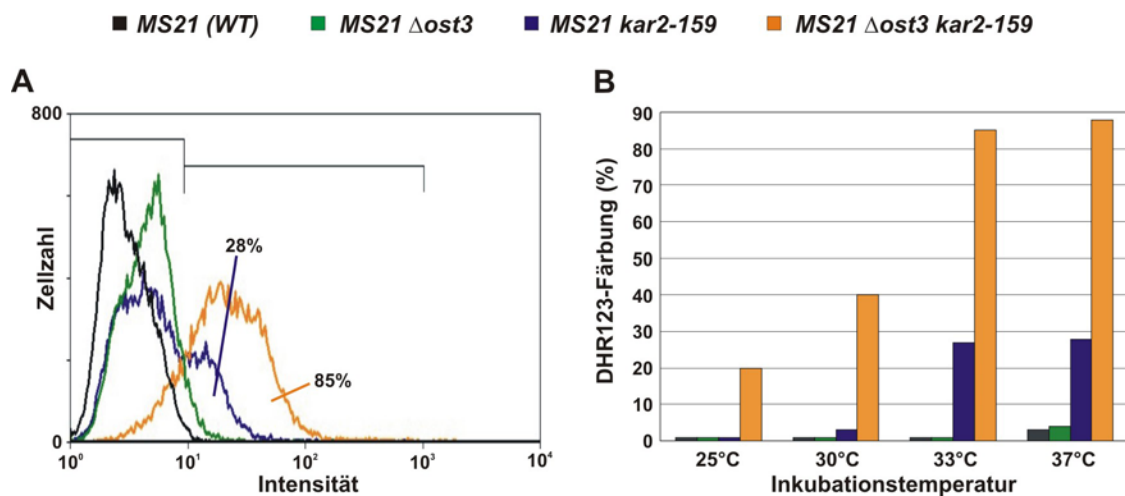


**Abbildung II.43: Durchflußzytometrische Analyse der Caspaseaktivität nach Inkubation der Stämme für 4 h in YPD bei unterschiedlichen Temperaturen.** Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

A: Die Kulturen wurden für 4 h bei 33 °C inkubiert. Die Unterscheidung zwischen gefärbten und ungefärbten Zellen wurde anhand der dargestellten Markierungen vorgenommen.

B: Die Kulturen wurden für 4 h bei 25 °C, 30 °C, 33 °C und 37 °C inkubiert und die Caspaseaktivität detektiert.

Des Weiteren wurde das Auftreten von ROS untersucht (Abb. II.44). Schon bei einer Inkubationstemperatur von 25 °C wies ein Fünftel der Zellen der Doppelmutante  $\Delta$ ost3kar2-159 ROS-Akkumulation auf. Inkubation bei höherer Temperatur führte zu einer schnellen Zunahme ROS-positiver Zellen von 20% (25 °C) auf 40% (30 °C) und 85% (33 °C). In der Einzelmутante kar2-159 konnte dagegen nur in wenigen Zellen ROS-Akkumulation nachgewiesen werden, 3% bei 30 °C und 27% bei 33 °C Inkubationstemperatur. Auch in diesem Versuch führte eine weitere Anhebung der Temperatur auf 37 °C zu einer marginalen Zunahme an ROS (Abb. II.44B). Die Ergebnisse der ROS-Produktion sind vergleichbar mit der aus der Analyse der Caspaseaktivität (Abb. II.43). Auch hier



**Abbildung II.44: Analyse von ROS-Akkumulation nach Inkubation der Stämme für 4 h in YPD bei unterschiedlichen Temperaturen mittels Durchflußzytometrie.** Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

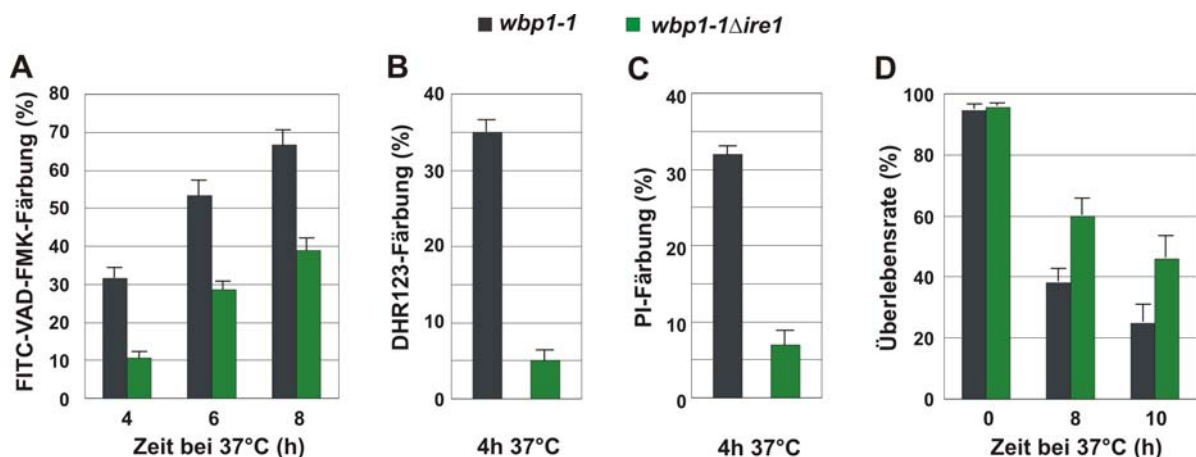
A: Die Kulturen wurden für 4 h bei 33 °C inkubiert und ROS-Produktion mittels DHR123 nachgewiesen.

B: Die Inkubation der Kulturen erfolgte bei 25 °C, 30 °C, 31 °C und 37 °C für je 4 h. Anschließend wurden die Zellen auf Färbung mit Rhodamin123 analysiert.

konnte in der  $\Delta ost3$  Mutante zu keinem Zeitpunkt ein messbarer Anstieg des apoptotischen Markers ROS festgestellt werden. Es ist denkbar, dass funktionelles Kar2p entweder die Missfaltung der Proteine behebt oder durch Induktion des UPR die Bereitstellung weiterer Chaperone sicherstellt. Nach Induktion der Mutation in  $kar2-159$  durch Erhöhung der Inkubationstemperatur kam es zu einer starken Zunahme an ROS, die durch Induktion des N-Glykosylierungsdefekts durch Disruption von  $OST3$  noch verstärkt wurde. Aus den Abbildungen II.43 und II.44 geht hervor, dass durch Anheben der Temperatur von 33 °C auf 37 °C keine weitere Steigerung der apoptotischen Phänotypen erreicht werden konnte. Dies ist sicherlich darauf zurückzuführen, dass bereits eine Inkubationstemperatur von 33 °C einen maximalen ER-Stress in den Mutanten  $kar2-159$  und  $\Delta ost3kar2-159$  auslöst (beide Kulturen zeigten einen Wachstumsphänotyp bei 34 °C, siehe oben).

### II.5.3 Konsequenzen der Disruption von *IRE1* und *HAC1*

Wie in Abschnitt II.5.1 beschrieben wurde, spielen Ire1p und Hac1p bei der Induktion des UPR und somit bei einer damit verbundenen Hochregulation von Genen, die für Degradation missgefalteter Proteine benötigt werden, eine entscheidende Rolle. Um die Auswirkungen eines nicht funktionellen UPR nach Induktion von N-Glykosylierungsdefekten in den Zellen zu studieren, wurden in der  $wbp1-1$  Mutante *IRE1* und im Wildtyp BY4741 *IRE1* und *HAC1* deletiert und Caspaseaktivität, ROS-Akkumulation, PI-Färbung und die Überlebensrate analysiert. Nach 4, 6 und 8 h bei 37 °C bewirkte die Disruption von *IRE1* einen Rückgang der Caspaseaktivität von 32% auf 10% (4 h), von 53% auf 28% (6 h) und von 67% auf 39% (8 h) im Vergleich zur  $wbp1-1$  Mutante mit intaktem *IRE1* (Abb. II.45A). Es wurde ebenso eine Reduktion der ROS-Produktion in  $wbp1-1\Delta ire1$  im Vergleich zu  $wbp1-1$  von 35% auf 5% nach 4 h bei 37 °C nachgewiesen (Abb. II.45B), was auch für die Anzahl an detektierten PI-positiven Zellen zutraf (Abnahme von 32% auf 7%, Abb. II.45C). In einem weiteren

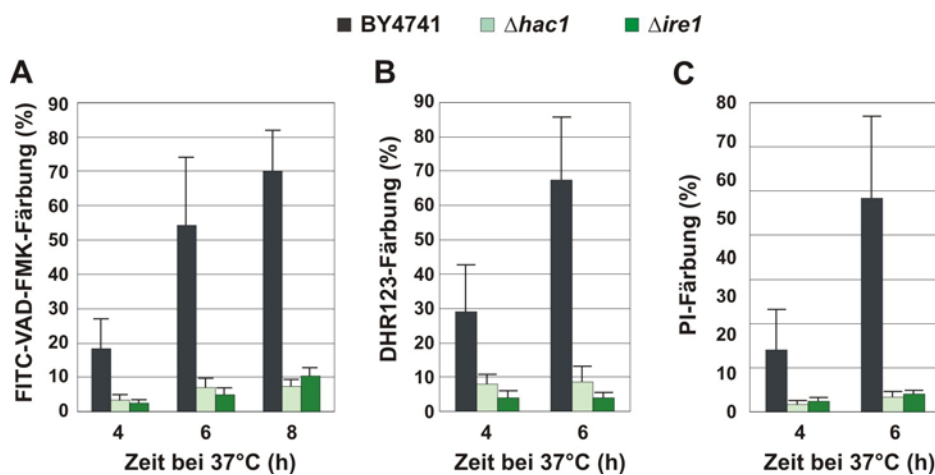


**Abbildung II.45: Auswirkung der Disruption von *IRE1* in  $wbp1-1$  auf apoptotische Phänotypen und Überlebensrate.**

Durchflußzytometrische Untersuchung der Caspaseaktivität (A), ROS-Akkumulation (B) und PI-Färbung (C) in  $wbp1-1$  und  $wbp1-1\Delta ire1$  nach Inkubation der Kulturen für unterschiedliche Zeiten bei restriktiver Temperatur. D: FACS-Analyse der Überlebensrate von  $wbp1-1$  und  $wbp1-1\Delta ire1$  nach 8 h und 10 h Inkubation bei 37 °C.

Experiment wurde die Überlebensrate beider Stämme nach Induktion des N-Glykosylierungsdefekts für 8 und 10 h bei 37 °C dokumentiert. Aus Abbildung II.45D geht hervor, dass trotz einer geringen Unterglykosylierung der Proteine nach Inkubation von *wbp1-1* bei 25 °C, wie es für die Carboxypeptidase C gezeigt wurde (Abb. II.10B), die Disruption von *IRE1* keine Auswirkungen auf die Überlebensrate hatte, da mehr als 95% der Zellen beider Kulturen überlebten. Nach Induktion des Defekts stieg die Überlebensrate der Disruptante nach 8 h bei 37 °C von 38% auf 60%, nach 10 h von 25% auf 46% an (Abb. II.45D).

Um die Auswirkungen eines stärkeren N-Glykosylierungsdefekts auf die Disruption von *IRE1* und *HAC1* untersuchen zu können, wurden der Wildtypstamm BY4741 und die entsprechenden Disruptanten aus der Euroscarf Deletionsgenbank für 4 bis 8 h bei 37 °C mit 10 µg/ml Tunicamycin



**Abbildung II.46:** Analyse von Caspaseaktivität (A), ROS-Akkumulation (B) und PI-Färbung (C) in BY4741,  $\Delta ire1$  und  $\Delta hac1$  nach Inkubation der Kulturen für unterschiedliche Zeiten bei 37°C mit 10 µg/ml Tunicamycin mittels Durchflußzytometrie.

behandelt. In BY4741 wurde eine starke Zunahme der Caspaseaktivität von 18% (4 h) auf 70% (8 h) nachgewiesen, wohingegen weniger als 5% der Disruptantenzellen Caspaseaktivität aufwiesen (4 h), die sich auch mit längerer Inkubationszeit nur marginal erhöhte (nach 8 h etwa 10%, Abb. II.46A). Auch nach Inkubation der Kulturen mit DHR123 zeigte nur ein Bruchteil der Disruptantenzellen positive ROS-Färbung. Im Gegensatz zum Wildtypstamm BY4741, der nach 4 h 29% und nach 6 h 67% ROS-positive Zellen aufwies, wurden in  $\Delta ire1$  und  $\Delta hac1$  auch nach 6 h weniger als 10% positive Zellen identifiziert (Abb. II.46B). Auch die Analyse von PI-positiven Zellen ergab ein ähnliches Resultat. In beiden Deletionsstämmen, BY4741 $\Delta ire1$  und BY4741 $\Delta hac1$ , konnte nach 6 h nur ein geringer Anteil der gefärbten Zellen nachgewiesen werden (weniger als 5%) im Vergleich zum korrespondierenden Wildtypstamm (48%, Abb. II.46C).

Im Gegensatz zu *kar2-159*, in der nach Temperaturstress eine Zunahme der apoptotischen Marker nachgewiesen wurde, zeigte sowohl  $\Delta ire1$  als auch  $\Delta hac1$  eine starke Reduktion dieser Phänotypen. Da in allen drei Fällen der UPR betroffen ist, ist der Befund unerwartet und kann im Augenblick nicht erklärt werden.

# III. Zusammenfassung

Programmierter Zelltod spielt eine zentrale Rolle bei der Organentwicklung und führt bei fehlerhaftem Ablauf zu einer Vielzahl unterschiedlichster Krankheitsbilder (siehe I.1.2). Welchen Stellenwert das programmierte Absterben der Zellen in der Forschung heutzutage einnimmt, zeigt der immense Anstieg an Veröffentlichungen, die sich mit dem Thema „Apoptose“ beschäftigen. Im vergangenen Jahr lag die Anzahl veröffentlichter Artikel über 15.000. Auch die Verleihung des Nobelpreises für Medizin im Jahre 2002 an Sidney Brenner, John Sulston und Robert Horvitz für ihre Forschungsarbeiten zur genetischen Regulation der Organentwicklung und des programmierten Zelltods spiegelt die Bedeutung dieses Themas wieder.

Erst lange nachdem apoptotische Phänotypen in Höheren Eukaryoten nachgewiesen werden konnten, zeigte sich, dass auch in einzelligen Organismen, wie beispielsweise der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, programmierter Zelltod auftritt. Hierbei entdeckte man nicht nur typische Apoptosemarker wie Chromatinkondensation, DNA-Fragmentierung, Phosphatidylserintranslokation, ROS-Produktion, Caspaseaktivität und Cytochrom *c* Translokation, sondern auch eine Reihe zu Säugern orthologe Apoptosegene (siehe I.1.5).

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag darin, die N-Glykosylierungsmutante *wbp1-1* sowie mit dem N-Glykosylierungshemmstoff Tunicamycin behandelte Wildtypstämme auf apoptotische Merkmale hin zu untersuchen. Ferner wurde in diesem Zusammenhang auch die Beteiligung von Autophagozytose als weitere Form des PCD näher untersucht und eine Interaktion beider Zelltodwege miteinander analysiert. Da in Hefe die bis jetzt einzige identifizierte Protease mit Caspase-ähnlicher Aktivität nicht in die Signalkaskade des programmierten Zelltods ausgelöst durch eine defekte N-Glykosylierung, wie in dieser Arbeit gezeigt, involviert ist, wurde außerdem hinterfragt, inwiefern weitere Proteine, besonders Proteasen, in diesem Signalweg eine Rolle spielen.

### **III.1 Durch eine defekte N-Glykosylierung wird ein Selbstmordprogramm in Hefe induziert**

Die Ergebnisse der Diplomarbeit von C. Riel, in der typische apoptotische Merkmale wie Chromatinkondensation, DNA-Fragmentierung und Phosphatidylserintranslokation in zwei N-Glykosylierungsmutanten nachgewiesen werden konnten (Abb. I.5) (Riel, 2000), deuteten darauf hin, dass das Absterben der defekten Zellen ein programmiertes Ereignis darstellt. Dies wird dadurch unterstrichen, dass durch Hemmung der Proteinneusynthese, wie in dieser Arbeit gezeigt, der PCD reduziert werden konnte (II.1.1.6).

Aufgrund dieser Befunde wurden weitere typische apoptotische Merkmale in der *wbp1-1* Mutante analysiert. Da Caspasen nicht nur in Säugern, sondern auch in *S. cerevisiae* eine zentrale Aufgabe in der Signalkaskade des programmierten Zelltods einnehmen (Abb. I.2), wurde die N-Glykosylierungsmutante *wbp1-1* auf aktive Caspasen untersucht. Caspase-ähnliche Aktivität konnte sowohl *in vivo* durch die Spaltung von D<sub>2</sub>R und durch die Bindung des mit FITC markierten Breitspektrum-Caspasehemmstoffs VAD-FMK als auch *in vitro* durch Spaltung von aus Säugern bekannten Caspasesubstraten identifiziert werden (II.1.1.1), obgleich diese Aktivität unabhängig von der in *S. cerevisiae* entdeckten Caspase Yca1p zustande kam (II.3.1.2).

Ein weiteres wichtiges Merkmal für eine Induktion der apoptotischen Signalkaskade ist die Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). In *wbp1-1* konnte nach Inkubation der Zellen bei restriktiver Temperatur mit zwei verschiedenen Sonden, DHR123 und H<sub>2</sub>DCFDA, ROS-Akkumulation visualisiert werden (II.1.1.2). ROS wird in den Zellen neben dem ER vor allem in den Mitochondrien gebildet, von wo aus es ins Cytosol gelangt, um seine pro-apoptotische Wirkung entfalten zu können. Dabei scheint die Fragmentierung der Mitochondrien, wie sie in *wbp1-1* durch Expression eines mitochondriellen GFP-Fusionsproteins mittels konfokaler Mikroskopie gezeigt werden konnte (II.1.1.3), eine wichtige Rolle einzunehmen. Durch Disruption von Uth1p, ein Protein das für die Mitochondrienfragmentierung notwendig ist, konnten sämtliche untersuchte apoptotische Phänotypen unterdrückt werden (II.4.4). Ebenso reduzierte die Inkubation der Kulturen mit dem antioxidierenden Agens Glutathion oder der modifizierten Aminosäure N-Acetyl-L-Cystein, die von den Zellen besser aufgenommen wird als die für die Glutathionbildung benötigte Aminosäure Cystein, nicht nur ROS-Akkumulation, sondern auch Caspase-ähnliche Aktivität und verbesserte die Überlebensrate (II.1.1.5). Dies beweist, dass Mitochondrien bei der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und bei der Weiterleitung des Apoptosesignals in *wbp1-1* eine sehr wichtige Funktion einnehmen.

Im Säuger kommt dem anti-apoptotischen Protein *Bcl-2* eine bedeutende Rolle bei der Hemmung der Apoptose zu. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch Überexpression des humanen *Bcl-2*, nicht aber von *Bcl-x<sub>L</sub>*, apoptotische Merkmale reduziert und die Überlebensrate erhöht wurden (I.1.1.7). Dies deutet darauf hin, dass in Hefe ein dem humanen *Bcl-2* in Struktur und Funktion

ähnliches Protein präsent sein muss, das die durch ER-Stress induzierte Apoptose minimiert. Dies kann zugleich neben den detektierten apoptotischen Merkmalen als ein weiterer Hinweis dafür gelten, dass in *S. cerevisiae* während der Evolution eine zumindest in den Grundzügen dem Säuger ähnliche apoptotische Signalkaskade konserviert worden ist.

Für einen programmierten Zelltod sprechen außerdem die Ergebnisse der Transkriptomanalyse. Nach Induktion der Apoptose in *wbp1-1* konnte eine Hochregulation von Genen nachgewiesen werden, die für DNA-Reparatur und Konformation der Telomere wichtig sind (II.1.1.4). Dies untermauert die Befunde einer DNA-Fragmentierung in *wbp1-1*. Des Weiteren wurde eine Hochregulation der m-RNA von Membranproteinen und von Proteinen festgestellt, die für die mitochondrielle Morphologie wichtig sind. Denkbar wäre, dass die Zellen durch Membranstabilisierung einer Fragmentierung der Mitochondrien entgegenwirken (II.1.1.3) oder dass sie versuchen, die ROS-Konzentration in den Mitochondrien durch eine Ausdehnung der Mitochondrienmembran zu verringern und so das programmierte Absterben der Zellen zu verzögern.

Die Hochregulation einer weiteren Gruppe von Proteinen, die in die Stabilisierung der Zellwand und Zellmembran involviert ist, konnte ebenfalls nachgewiesen werden (II.1.1.8). Durch osmotische Stabilisierung der *wbp1-1* Mutante mit 1 M Sorbit konnte gezeigt werden, dass bei einer späten Wachstumsphase der Kultur bei restriktiver Inkubationstemperatur apoptotische Phänotypen reduziert werden konnten. Im Gegensatz dazu hatte die osmotische Stabilisierung bei einer frühen Wachstumsphase der Kultur keine Auswirkungen auf den PCD (II.1.1.8). Dies legt nahe, dass der programmierte Zelltod in der *wbp1-1* Mutante primär durch den N-Glykosylierungsdefekt, zumindest bei einer frühen Wachstumsphase der Kultur, induziert worden war. Eine weitere Gruppe von hochregulierten Genen ist am so genannten „unfolded protein response“ (UPR) beteiligt (II.5.1). Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass durch vermehrte Produktion von Chaperonen der Missfaltung von Proteinen entgegengewirkt wird. Denkbar wäre außerdem, dass dies aufgrund des anhaltenden ER-Stress zu keiner Verbesserung führt und die Zellen möglicherweise damit beginnen, diese Proteine entweder in die Vakuole oder nach Ubiquitinierung zum Proteasom zu transportieren, wo sie anschließend degradiert werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Hemmung des UPRs durch eine Mutation in *KAR2*, die dazu führt, dass keine Ire1p vermittelte Anschaltung des UPRs mehr stattfinden kann, eine starke Zunahme an Caspase-ähnlicher Aktivität und ROS-Produktion zur Folge hat (II.5.2).

Aufgrund der genannten Befunde in der *wbp1-1* Mutante wurde des Weiteren untersucht, ob sich diese im Wildtyp nach Hemmung der N-Glykosylierung durch Tunicamycin bestätigen lassen. Es stellte sich heraus, dass TM bei der für *Saccharomyces cerevisiae* typischen Wachstumstemperatur von 30°C zu keinem Anstieg der analysierten Apoptosemarker führte. Erst eine Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 37 °C induzierte Caspaseaktivität und ROS-Akkumulation (II.1.2.1), die wiederum durch Hemmung der Proteinneusynthese durch Cycloheximid, durch Reduktion reaktiver



Sauerstoffspezies mit NAC oder durch Hemmung von Caspase-ähnlichen Proteasen mit dem aus Säugern bekannten Caspaseinhibitor zVAD-FMK vermindert werden konnten (II.1.2.2). Durch Inkubation der Zellen mit TM konnte ebenso eine Veränderung in der Mitochondrienmorphologie nachgewiesen werden (II.1.2.3).

Neben Apoptose wurde in den letzten Jahren auch Autophagozytose als eine weitere Form des programmierten Zelltods definiert. Bei der Auswertung der Transkriptomanalyse fiel auf, dass neben Atg8p, das als Markerprotein für die Induktion von Autophagozytose verwendet wird, 19 weitere autophagozytotische Proteine mindestens um den Faktor 2 hochreguliert wurden (II.4.1). Dies deutete stark darauf hin, dass möglicherweise auch Autophagozytosevorgänge in die vorliegende Signalkaskade involviert sind. Nach Disruption der Autophagozytosegene *ATG8* und *ATG5*, die in unterschiedlichen Schritten der Autophagozytose wirken, konnte eine Reduktion sowohl der Caspase-ähnlichen Aktivität, als auch der ROS-Akkumulation und Anzahl an PI-positiven Zellen nachgewiesen werden. Dies galt nicht nur für *wbp1-1*, sondern auch für den Wildtypstamm nach Inkubation mit Tunicamycin (II.4.3). Diese Resultate legen nahe, dass das Auftreten apoptotischer Phänotypen eine funktionsfähige Autophagozytose benötigt (Abb. III.1A und B). Möglicherweise verhält es sich in *S. cerevisiae* ähnlich wie im Säuger oder in *Drosophila melanogaster* (Scott *et al.*, 2007; Yousefi *et al.*, 2006). Hier konnte nachgewiesen werden, dass einzelne Komponenten der autophagozytotischen Maschinerie, wie Atg5p oder Atg1p, zu einer Aktivierung pro-apoptotischer Komponenten der apoptotischen Signalkaskade führten, was letztendlich im programmierten Absterben der Zellen endete (II.4.3).

### **III.2 Identifizierung von Proteinen, die in die Signalkaskade des programmierten Zelltods involviert sind**

Für einige Proteine ist in der Literatur belegt, dass sie in der apoptotischen Signalkaskade in *S. cerevisiae* eine mehr oder weniger wichtige Rolle einnehmen. Um deren Funktion auch im durch eine defekte N-Glykosylierung ausgelösten PCD zu untersuchen, wurden die Gene *AIF1* (II.2.2.1), *NDII* (II.2.2.2) und *NMA111* (II.2.2.3) in *wbp1-1* disruptiert bzw. überexprimiert und Caspase-ähnliche Aktivität, ROS-Akkumulation und die Überlebensrate untersucht. Doch weder Überexpression (*AIF1*), noch Disruption (*AIF1*, *NDII* und *NMA111*) hatten einen Einfluss auf die analysierten apoptotischen Phänotypen.

Nach Auswertung der Transkriptomanalyse wurde der Fokus auf ein Protein gelegt, Yet2p, das nach Induktion des N-Glykosylierungsdefekts um mehr als das 9fache hochreguliert war und zudem Homologie zu BAP31 des Säugers aufwies. BAP31 wirkt in seiner Volllängenform anti-apoptotisch, in der verkürzten Version jedoch pro-apoptotisch. Nach Disruption von *YET2* in *wbp1-1* konnte eine

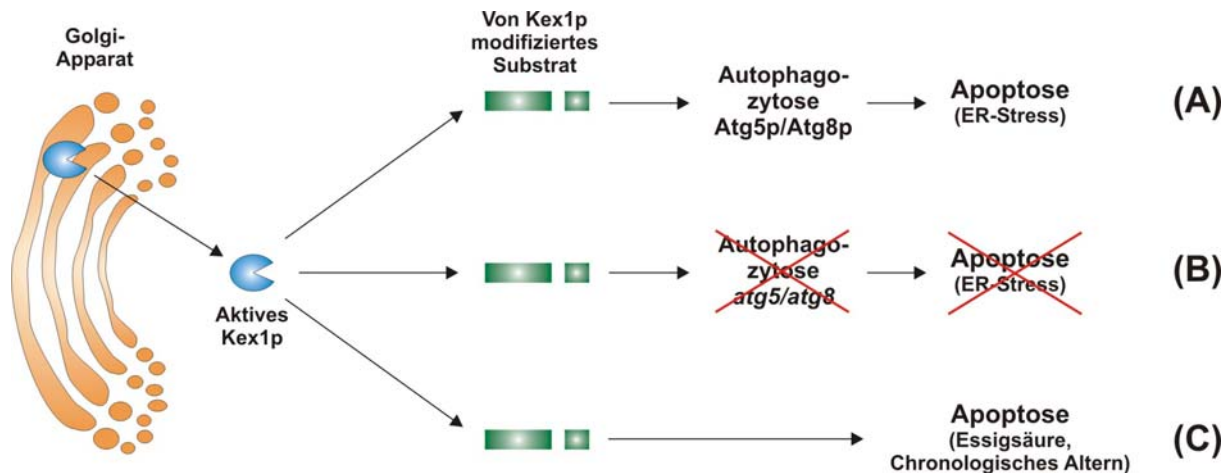
Verbesserung der Überlebensrate und eine Reduktion der Caspase-ähnlichen Aktivität bzw. nach Überexpression eine Steigerung dieser nachgewiesen werden (II.2.2.4). Dies deutet darauf hin, dass Yet2p möglicherweise als pro-apoptotisches Protein in diese Signalkaskade involviert ist. Da die Änderungen der analysierten Marker jedoch nur gering waren, wurde das Hauptaugenmerk auf zwei Proteasen gerichtet, Qri7p und Kex1p, die nach Analyse der Caspase-ähnlichen Aktivität in Stämmen der Deletionenbank von Euroscarf identifiziert werden konnten.

Nachdem die mitochondrielle Lokalisation von Qri7p durch konfokale Mikroskopie (Abb. II.20) und Western-Blot Analyse bestätigt werden konnte (Abb. II.22), wurden sämtliche apoptotische Merkmale nach Disruption und Überexpression von Qri7p in *wbp1-1* untersucht. Beides führte zu einer Veränderung der Caspase-ähnlichen Aktivität, der ROS-Akkumulation und der Überlebensrate, so dass aufgrund der Ergebnisse diesem Protein eine pro-apoptotische Funktion zukommen könnte. Aufgrund der mitochondriellen Lokalisation liegt nahe, dass Qri7p bei der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies oder an deren Freisetzung aus den Mitochondrien ins Cytosol beteiligt sein könnte.

Eine weitere Protease, Kex1p, die als Membranprotein im Golgi-Apparat lokalisiert ist, wurde ebenfalls im oben genannten Screen als pro-apoptotisches Protein in der untersuchten Signalkaskade identifiziert. Nach Disruption von *KEX1* in *wbp1-1* verbesserte sich das Wachstumsverhalten (II.3.1.1) und die Überlebensrate der Zellen (II.3.1.4). Zugleich wurden Caspase-ähnliche Aktivität (II.3.1.2), ROS-Akkumulation (II.3.1.3), das Schrumpfen der Zellen (II.3.1.5) und die Fragmentierung der Mitochondrien (II.3.1.6) reduziert. Wie erwartet konnten auch in einem  $\Delta kex1$  Stamm nach Inkubation mit Tunicamycin bei 37 °C apoptotische Phänotypen reduziert und die Überlebensrate verbessert werden (II.3.2.1). Nachdem Kex1p erstmals eine Involvierung in eine Signalkaskade des PCD nachgewiesen werden konnte, wurde darüber hinaus eine generelle Beteiligung von Kex1p in weitere gut charakterisierte apoptotische Signalkaskaden der Hefe, wie bei der chronologischen Alterung und der Induktion von Apoptose durch Essigsäurestress, untersucht. Disruption von *KEX1* führte zu einer deutlichen Verlängerung der Lebensspanne in chronologisch gealterten Kulturen (II.3.2.2). Auch konnte eine starke Reduktion von ROS und ein Anstieg der Überlebensrate in mit Essigsäure behandelten Kulturen nachgewiesen werden (II.3.2.3). Dagegen hatte die Überexpression von Kex1p keine Auswirkungen auf Caspase-ähnliche Aktivität und ROS-Akkumulation (II.3.4).

Wie die Kex1 Protease in die Signalkaskade des programmierten Zelltods involviert ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Es sind jedoch mehrere Szenarien denkbar (siehe Abb. III.1). Kex1p könnte neben der Prozessierung der beiden bisher bekannten Substrate (siehe II.3) noch weitere modifizieren, die nach ihrer Aktivierung pro-apoptotisch auf die Signalkaskade einwirken (Abb. III.1A). Denkbar wäre, dass es durch den anhaltenden ER-Stress zu einer Destabilisierung der Golgi-Membran und einer dadurch zustande kommenden Translokation der katalytischen Domäne von Kex1p vom Lumen des Golgi-Apparats in das Cytosol kommt. Somit könnten dann Substrate, die in intakten Zellen für die Protease nicht zugänglich sind, von dieser gespalten werden, was zur Induktion

von Apoptose führen könnte. Beispielsweise könnte ein von Kex1p aktiviertes Protein in die Mitochondrien transportiert werden, wo es an der Bildung von ROS oder an der Fragmentierung der Mitochondrien beteiligt ist. Eine Involvierung von Kex1p an der Signalkaskade des PCD induziert durch chronologisches Altern und Essigsäurestress konnte ebenso nachgewiesen werden (Abb. III.1C). Zumindest für chronologisch gealterte Kulturen wäre ein ähnliches Szenario denkbar. Durch die



**Abbildung III.1:** Mögliche Szenarien der Induktion des programmierten Zelltods durch ER-Stress in *S. cerevisiae*.

Durch Aktivierung eines bislang unbekannten Substrats durch die Protease Kex1p kommt es zur Induktion von Autophagozytose und Apoptose (A). Die Disruption von für die Autophagozytose notwendigen Proteinen wie ATG5 oder ATG8 führt sowohl zur Hemmung von Autophagozytose, als auch von Apoptose (B). Ein von Kex1p modifiziertes Substrat ist ebenso in die Signalkaskaden des PCD induziert durch chronologisches Altern oder Essigsäurestress involviert (C).

erhöhte Mutationsrate in älteren Zellen könnte es unter anderem zu Störungen in der Translation und einer daraus resultierenden Missfaltung von Proteinen kommen. Dies könnte wiederum Auswirkungen auf die Stabilität der Golgi-Membran haben und zu Kex1p Aktivität im Cytosol führen. Für die Signalkaskade des PCD ausgelöst durch einen Defekt in der N-Glykosylierung konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von Autophagozytose zu einer Reduktion der Apoptosemarker führt (Abb. III.1B). Ob jedoch Kex1p für die Induktion der Autophagozytose oder für die Signalkaskade der Apoptose notwendig ist, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

## **IV Materialien**

### **IV.1 Verwendete Geräte**

LSM 510 META, Carl Zeiss, Jena, Deutschland

MoFlo high speed sorter, Cytomation Bioinstruments, Freiburg, Deutschland

### **IV.2 Chemikalien und Zubehör**

Alle eingesetzten Chemikalien und Lösungsmittel wurden, falls nicht anders angegeben, von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

**Amersham LIFE SCIENCE:** Amplify<sup>TM</sup>-Lösung, ECL Western Blotting Detection System, IgG Sepharose 6 Fast Flow, Protein-A-Sepharose<sup>TM</sup> CL-4B, [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein

**Bachem AG:** FA-Ala-Arg-OH

**Beckman Coulter:** Flow-Check Fluorosphere (10µm Durchmesser)

**Bio101:** CSM-drop-out-Medien

**Biomol:** Caspase Fluorescent (AFC) Substrate/Inhibitor *QuantiPak*<sup>TM</sup>, Caspase Inhibitor (Broad Spectrum) zVAD-FMK

**BioRad:** Bromphenolblau, Coomassie "Brilliant Blue" G250, Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Standards (unstained), SDS-PAGE Molecular Weight Standards (Low Range)

**Braun Biotech International:** Glasperlen (Ø 0,4-0,6 mm)

**Calbiochem-Novabiochem GmbH:** Ac-VEID-AMC, Nonidet, G 418 Sulfat (Kanamycin), Hepes, CHAPS, Z-IETD-AFC

**Difco:** Bacto Agar, Bacto Peptone, Bacto Tryptone, Bacto Yeast Extract, Yeast Nitrogen Base w/o amino acids

**Domimed:** Fuji Röntgenfilme RX 100

**Fermentas:** Gene Ruler<sup>TM</sup> 100 bp DNA Ladder Plus, Lambda DNA/*Eco*R1 + *Hind*3 Marker (3), IPTG, X-Gal

**Finnzymes:** Phusion<sup>TM</sup> High-Fidelity DNA Polymerase

**Fluka Chemie:** Litiumacetat

**Gibco:** Pferdeserum, ElektroMAX™ DH10B™ Cells

**Heirler Cenovis:** Bio Magermilchpulver

**Hellma GmbH & Co. KG:** Präzisionsküvette aus Quarzglas Suprasil (10mm)

**Interchim:** BSA Standard, Coo Protein Assay Reagent

**Kodak:** BioMax™ MR Röntgenfilme

**New England BioLabs:** BSA, Restriktionsenzyme, T4 DNA Ligase

**PeqLab:** Elektroporationsküvetten, dNTPs, peqGOLD Universal Agarose, peqGOLD ProteinMarker

**Pierce:** SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate

**Promega:** CaspACE™ FITC-VAD-FMK *in Situ* Marker

**Qiagen:** TaqDNA-Polymerase

**Roche:** Ampicillin, Aprotinin, Benzamidin, Ethidiumbromid, Leupeptin, PMSF, RNase A

**Roth:** Acrylamid-/N'-N'-Methylenbisacrylamidlösung (30/0,8%, w/v) für Proteingele, Ethanol p.A., Phenol p.A., Glasperlen (Ø 0,25-0,5 mm), Trichloressigsäure

**Schleicher und Schuell:** Nitrocellulose Optitran BA-S85

**Schubert & Weiss Omnilab:** 5ml Polypropylene Round-Bottom Tube für „FACS“ (12x75mm)

**Seikagaku Kogyo:** Zymolyase 100 T (100.000 U/g) aus *Arthrobacter luteus*

**Serva:** APS, DTT, Dodecylsulfat Na-Salz (SDS)

**Sigma:** AFC-Standard, (7-Amino-4-Trifluoromethylcoumarin)Aminosäuren, AMC-Standard (7-Amino-4-Methylcoumarin), Ammoniumpersulfat (APS), Anti-Rabbit IgG (whole molecule) Peroxidase conjugate A-6154, Bromphenolblau, Cycloheximid, Caffein, D-(+)-Galaktose, 4'-6-Diamidino-2-phenylindole, Dihydrorhodamin 123, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS), Fluorescent Brightener 28 (Calcofluor White M2R), Immersionsöl (UV transparent, fluoreszenzfrei), Lachssperm-DNA Typ 2 (Na-Salz), Monoclonal Anti-FLAG® antibody, Orthovanodat, Pepstatin, Ponceau S Lösung, PEG 4000, TEMED, Triton-X-100, Tunicamycin aus *Streptomyces sp.*, Tween 20

**Thermo Hybaid:** Synthetische Oligonukleotide, D<sub>2</sub>R

**USB:** Tris

**Whatman:** 3MM Chromatographiepapier

### IV.3 Kits

In Tabelle IV.1 sind die in der Arbeit verwendeten Kits aufgelistet.

Kitbezeichnung und Verwendung	Firma
QIAprep <sup>®</sup> Spin Miniprep Kit, Plasmidisolierung aus <i>E.coli</i>	Quiagen
MiniElute <sup>™</sup> Gel Extraction Kit, Fragmentisolierung aus Gel (bis 4kb)	Quiagen
QIAquick Gel Extraction Kit, Fragmentisolierung aus Gel (bis 10kb)	Quiagen
Nucleobond PC 10000, Plasmidisolierung aus <i>E.coli</i> nach Genbankamplifizierung	Macherey-Nagel

Tabelle IV.1: Verwendete Kits.

### IV.4 Antikörper

Tabelle IV.2 zeigt die in der Arbeit verwendeten Antikörper.

Antikörper	Firma
Anti-Maus IgG (whole molecule)-Peroxidase Antikörper aus Kaninchen (polyklonal) (A9044)	Sigma
Anti-Kaninchen IgG-Meerrettichperoxidase Antikörper aus Ziege (polyklonal) (Sc2004)	Santa Cruz
Antiserum gegen Hefe Cytochrom <i>c</i> aus Kaninchen	Prof. Dr. R. Lill (Philipps-Universität Marburg)
Anti-FLAG <sup>®</sup> M2 Antikörper (monoklonal) (F3165)	Sigma
Anti-CPY aus Kaninchen (polyklonal)	hergestellt von Prof. Dr. L. Lehle

Tabelle IV.2: Verwendete Antikörper.

### IV.5 Verwendete Organismen

#### IV.5.1 *E. coli*

Stämme	Genotyp	Referenz
DH10B	F <sup>-</sup> , <i>mcr</i> A, Δ( <i>mrr</i> - <i>hsd</i> RMS - <i>mcr</i> BC), φ80 <i>dlac</i> ZΔ <i>M15</i> , Δ <i>lac</i> X74, <i>deo</i> R, <i>rec</i> A1, <i>end</i> A1, <i>ara</i> D139, Δ( <i>ara</i> , <i>leu</i> ) 7697, <i>gal</i> U, <i>gal</i> K, <i>rsp</i> L, <i>nup</i> G (p3:Km <sup>r</sup> , amber amp <sup>r</sup> , amber tet <sup>r</sup> )	BRL <sup>™</sup> Grant <i>et al.</i> (1990)
XL-1 blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup>Z ΔM15 Tn10 (tet<sup>R</sup>)</i> ]	Bullock <i>et al.</i> (1987)

Tabelle IV.3: Verwendete *E. coli* Stämme.

#### IV.5.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Alle verwendeten Stämme der Euroscarf Deletionsgenbank stammten vom Wildtyp BY4741 ab und wurden nicht separat aufgeführt. Die Deletion der entsprechenden Gene wurde per PCR-Analyse überprüft. Disruptionen in *SS328* und *wbp1-1* wurden mit einer entsprechenden *KAN*-Kassette durchgeführt (amplifiziert aus dem Plasmid pUG6) und wurden ebenfalls nicht gesondert aufgeführt.

Für die genomische Markierung von Genen wurden mittels PCR aus den Plasmiden pZZ-KAN und pZZ-HIS entsprechende Kassetten amplifiziert und in die Transformation eingesetzt.

Stämme	Genotyp	Referenz
<b>SS328</b>	<i>MATα ade2-101 ura3-52 his3Δ200 lys2-801</i>	(Vijayraghavan <i>et al.</i> , 1989)
<b>BY4741</b>	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ met15Δ0 ura3Δ</i>	Euroscarf
<b>BY4742</b>	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ lys2Δ ura3Δ</i>	Euroscarf
<b>MS21</b>	<i>MATα ura3-52 trp1-d1</i>	(M. Rose, Princeton University, New Jersey)
<b>MS21 Δost3</b>	<i>MATα ura3-52 trp1-Δ1 Δost3::URA3</i>	(Friedrich, 1997)
<b>MS21 kar2-159</b>	<i>MATα ura3-52 kar2-159</i>	(Rose <i>et al.</i> , 1989)
<b>MS21 kar2-159 Δost3</b>	<i>MATα ura3-52 kar2-159 Δost3::URA3</i>	(Friedrich, 1997)
<b>WCG</b>	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3</i>	(Thumm <i>et al.</i> , 1994)
<b>WCGΔpep4</b>	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 Δpep4::HIS3</i>	(Thumm <i>et al.</i> , 1994)
<b>WCGΔpep4Δkex1</b>	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 Δpep4::HIS3 Δkex1::kanMX</i>	diese Arbeit
<b>wbp1-1</b>	<i>MATα ade2-101 ura3-52 his3Δ200 lys2-801 wbp1-1</i>	(te Heesen <i>et al.</i> , 1993)

Tabelle IV.4: Verwendete *Saccharomyces cerevisiae* Stämme.

## IV.6 Plasmide

In Tabelle IV.5 sind die in der Arbeit verwendeten Plasmide aufgelistet.

Plasmid	Genotyp	Referenz
YEp352	<i>2μ ori, URA3, lacZ, Amp<sup>R</sup> (bla)</i>	(Hill <i>et al.</i> , 1986)
pDP34	<i>GAL10, 2μ, URA3, myc, Amp<sup>R</sup> (bla)</i>	(Clow <i>et al.</i> , 1998)
pVT100-U	<i>ADH1, 2μ ori, F1 ori, URA3, Amp<sup>R</sup> (bla)</i>	(Vernet <i>et al.</i> , 1987)
pVT100-ZZ	<i>ADH1, 2μ ori, F1 ori, URA3, Amp<sup>R</sup> (bla)</i>	Stolz J. (nicht publiziert)
pVT100-GFP	<i>ADH1, 2μ ori, F1 ori, URA3, Amp<sup>R</sup> (bla)</i>	Stolz J. (nicht publiziert)
pVT100-mt-GFP	<i>ADH1, 2μ ori, F1 ori, URA3, Amp<sup>R</sup> (bla), mt-GFP</i>	(Westermann und Neupert, 2000)
YEplac181-mRFP	<i>2μ ori, pBR322 ori, LEU2, lacZ, Amp<sup>R</sup> (bla), mRFP</i>	Grossmann G. (nicht publiziert)

Tabelle IV.5: Verwendete Plasmide.

## IV.7 Oligonukleotide

In Tabelle IV.6 zeigt die in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

Oligonukleotide	Sequenz 5' → 3'	Verwendungszweck
<i>AIF1</i> KAN 5fw	GCAGTGATAA ATCATTGATA GACACACATT TCCTCATCGT TGTTCTTCAT TATTTACAGG AAAGAGCcg ctgaagcttc gtae	Amplifizierung der KAN-Kassette für die Disruption des ORFs <i>AIF1</i>
<i>AIF1</i> KAN 3rev	GCTGCAGTTC ATATTTTGT CTATTTTGTG AATAAAGGTT CCATTTTGTG GGAGAAAAGA TTCTTCGgca tagccacta gtggatct	Amplifizierung der KAN-Kassette für die Disruption des ORFs <i>AIF1</i>
<i>AIF1</i> minus 218fw	GGTAATACTG GATTAGTAAT CG	Überprüfung der Disruption des ORFs <i>AIF1</i>
<i>AIF1</i> plus 1345rev	CGATTGATAA CTCTAATGCA CAGG	Überprüfung der Disruption des ORFs <i>AIF1</i>
<i>ATG5</i> KAN 5fw	GCATGCTCAG AAGTGCAGT GAATTTTGT TCTTTTGGTT CTAGAAGAAC GGAGATAGGA Acagctgaag ctctgtae	Amplifizierung der KAN-Kassette für die Disruption des ORFs <i>ATG5</i>
<i>ATG5</i> KAN 3rev	CGTATAAATG TGGCCCTATT TTCAACGTCC AAGTTATTT CTGCGATATT TGAATGACAC gcatagccca ctatggatct	Amplifizierung der KAN-Kassette für die Disruption des ORFs <i>ATG5</i>
<i>ATG5</i> minus 196fw	CCAACTGTGG CAAGAACATC G	Überprüfung der Disruption des ORFs <i>ATG5</i>
<i>ATG5</i> plus 1065rev	CCACTCATGA GTTTTGTAGT TCG	Überprüfung der Disruption des ORFs <i>ATG5</i>
<i>ATG8</i> KAN 5fw	CAACCGATAA TGTTGTATAA TACCCGTGAA ATCATAGCAC ATGATATATC ATCACCCTGA GGcagctgaa gctctgtae	Amplifizierung der KAN-Kassette für die Disruption des ORFs <i>ATG8</i>
<i>ATG8</i> KAN 3rev	GGAACAATAG ATGGCTAATG AGTCCCTATA ATTTCGATTT TAGATGTAA CGCTTCATT Cgcatagccc actatggatct	Amplifizierung der KAN-Kassette für die Disruption des ORFs <i>ATG8</i>
<i>ATG8</i> minus 363fw	GAACAATCTA TTAATGACAC C	Überprüfung der Disruption des ORFs <i>ATG8</i>
<i>ATG8</i> plus 590rev	CGTAATCTGT AAGTAAATAC C	Überprüfung der Disruption des ORFs <i>ATG8</i>
<i>ATG8-ZZ-KAN</i> 5fw	GGTTTTTGTA TGTCACCTAC TCAGGAGAAA ATACATTGG CAGGGGAGCA GGGGCGGGTG C	Genomische Markierung von <i>KEX1</i> mit einem ZZ-Epitop
<i>ATG8-ZZ-KAN</i> 3rev	CGAATTTTT ATGTAAACAT TCTTATACTG GAACAATAGA TGGCAGGTG ACGGTATCG	Genomische Markierung von <i>KEX1</i> mit einem ZZ-Epitop
<i>ATG15</i> KAN 5fw	GCTTTTGAGA CACTCAAATC AGTGCAACC TTTTGGATAA GTCAAAGAAA GTACGCCGCT GCcagctgaa gctctgtae	Amplifizierung der KAN-Kassette für die Disruption des ORFs <i>ATG15</i>
<i>ATG15</i> KAN 3rev	CCTTTCACCT TAAAGCAGTA TTAATATATC TTCTCGTGC GTTTAGCTGA ACCTTTAAGT TGTCgcatag ccactatgt gatct	Amplifizierung der KAN-Kassette für die Disruption des ORFs <i>ATG15</i>
<i>ATG15</i> minus 237fw	GCACCTTTGT TCAACAGTAC	Überprüfung der Disruption des ORFs <i>ATG15</i>
<i>ATG15</i> plus 1788rev	CGAGTGTGTG AGTTTGCTAG	Überprüfung der Disruption des ORFs <i>ATG15</i>
<i>HAC1</i> KAN 5fw	GAACCTAATA GTAATTCGCA ATCGAAGTTC GCTATCCCTA CCAACTTCAA GTCGACTCTG Ccagctgaag ctctgtae	Amplifizierung der KAN-Kassette für die Disruption des ORFs <i>HAC1</i>
<i>HAC1</i> KAN 3rev	CCTCTTCTTC TTCGTTTGA GTAGCACACA CTAACCGGAG ACAGAACAGT AGAAACCAG catagccca tagtgatct	Amplifizierung der KAN-Kassette für die Disruption des ORFs <i>HAC1</i>
<i>HAC1</i> minus 1597fw	CACCTCAATG GACAACTCGA G	Überprüfung der Disruption des ORFs <i>HAC1</i>
<i>HAC1</i> plus 1211rev	GGGTCTTGTT CAAGAGCTAT G	Überprüfung der Disruption des ORFs <i>HAC1</i>
<i>IMP1</i> KAN 5fw	GCACAGCAAA TTTATAACAC TCTGACAATC TAAGTATTT TGGGGAAAA ACATTCCTTC cagctgaag ctctgtae	Amplifizierung der KAN-Kassette für die Disruption des ORFs <i>IMP1</i>



<i>IMP1</i> KAN 3rev	GCTTACTGAC ATCTACCAAG TTCCTGAGAT CTTTTGGTCA AACAATCTAG ATTGTTCTGgc atagcccaat agtggatct	Amplifizierung der KAN-Kassette für die Disruption des ORFs <i>IMP1</i>
<i>IMP1</i> minus 235fw	GGTGTAAAT TTAATGCAACC	Überprüfung der Disruption des ORFs <i>IMP1</i>
<i>IMP1</i> plus 806rev	GGTTTGAAGT TATCTTCGC	Überprüfung der Disruption des ORFs <i>IMP1</i>
<i>IRE1</i> KAN 5fw	CCATTATCAC TTTTCTCCAT ATCACCCTTC ATACACATTA AAAAAACAGC ATATCTGAGG cagctgaagct tegtacgc	Amplifizierung der KAN-Kassette für die Disruption des ORFs <i>IRE1</i>
<i>IRE1</i> KAN 3rev	GCAAGGGCGT AAAAATTATG GATGGTTACT ACTAATGATC AAAGTAACAT TAATGCAATA ATCgcatagc ccactagtgg atct	Amplifizierung der KAN-Kassette für die Disruption des ORFs <i>IRE1</i>
<i>IRE1</i> minus 162fw	GCACTGTAA TAATCGGTAA TC	Überprüfung der Disruption des ORFs <i>IRE1</i>
<i>IRE1</i> plus 3516rev	CTGTCGGGTA GTTTATGTAG G	Überprüfung der Disruption des ORFs <i>IRE1</i>
KAN 1119fw	GTATTGATGT TGGACGAG	Überprüfung von Disruptionen
KAN 235rev	GGATGTATGG GCTAAATG	Überprüfung von Disruptionen
<i>KEX1</i> -ZZ KAN 5fw	GCCTTCCGAA CACTGAAATC GATGAATCTT TTGAGATGAC TGATTTTGA GCAGGGGCGG GTGC	Genomische Markierung von <i>KEX1</i> mit einem ZZ-Epitop
<i>KEX1</i> -ZZ KAN 3rev	CCCTTTAAAG AATTTATCTT TATGTCGCTG TTACTACGAA AAGCGTGTGC GAGGTCGACGG TATCG	Genomische Markierung von <i>KEX1</i> mit einem ZZ-Epitop
<i>KEX1</i> KAN 5fw	GCATACTTTG GTTAAAGAGT ACCTGGCTA TAGAATACCG TAGAGATAAA GACCcagctg aagcttctga cgc	Amplifizierung der KAN-Kassette für die Disruption des ORFs <i>KEX1</i>
<i>KEX1</i> KAN 3rev	GCCAAGTTAA AAATCAGTCA TCTCAAAAGA TTCATCGATT TCACTGTTTCG GAAGGCgcat agcccaatag tggatct	Amplifizierung der KAN-Kassette für die Disruption des ORFs <i>KEX1</i>
<i>KEX1</i> minus 237fw	GCTATAACTT TCAAGTTTTG TCACC	Überprüfung der Disruption des ORFs <i>KEX1</i>
<i>KEX1</i> plus 2267rev	CGCTGTTACT ACGAAAAGCG TGTGC	Überprüfung der Disruption des ORFs <i>KEX1</i>
<i>KEX1</i> 5'-3' HindIII	CCGAAGCTTA TGTTTTACAA TAGG	Amplifizierung des ORFs <i>KEX1</i> für Überexpression
<i>KEX1</i> 3'-5' XbaI	TGCTCTAGAA AAATCAGTCA TCTC	Amplifizierung des ORFs <i>KEX1</i> für Überexpression in <i>pVT100U</i>
<i>KEX1</i> 3'-5' XbaI + STOP	TGCTCTAGAT TAAAAATCAG TCATCTC	Amplifizierung des ORFs <i>KEX1</i> für Überexpression in <i>pVT100ZZ</i>
<i>KEX1</i> 3'-5' 792	CACTTAACGA ACGCACACG	Oligo für die Sequenzierung von <i>KEX1</i>
<i>KEX2</i> KAN 5fw	CCATACTAAG GATAAACTAA TCCCGTTGTT TTTTGGCTC GTCACATAAT TATAAACTAC TAACCcagct gaagcttctg acgc	Amplifizierung der KAN-Kassette für die Disruption des ORFs <i>KEX2</i>
<i>KEX2</i> KAN 3rev	CGAATCACGA TCGTCCGGAA GATGGAGGAA CATCAGGCTG TAATCTTGT AATTTATTGG AAGCgcatag ccactagtgt gatct	Amplifizierung der KAN-Kassette für die Disruption des ORFs <i>KEX2</i>
<i>KEX2</i> minus 260fw	GCTGAAGAGA ACAGTATTGA AACCG	Überprüfung der Disruption des ORFs <i>KEX2</i>
<i>KEX2</i> plus 2609rev	GCAAACAATG CAAAGTACAT CATAGG	Überprüfung der Disruption des ORFs <i>KEX2</i>
<i>NDI1</i> KAN 5fw	GGAGTTTTAA CTACCAATTG AGGAGTTTCA GGTAGGGTGT CAGTTTCATC ACATCATCGA ATTACcagct gaagcttctg acgc	Amplifizierung der KAN-Kassette für die Disruption des ORFs <i>NDI1</i>
<i>NDI1</i> KAN 3rev	GGTTTTGTTT AGAGGGTTTT AGAAAAAAA GGATGCAAAC TCAGGAAAAA ACGGTGCCTA CCACCgata gccactagt ggtatct	Amplifizierung der KAN-Kassette für die Disruption des ORFs <i>NDI1</i>
<i>NDI1</i> minus 162fw	GGTTATTGCC GGTATTTCG	Überprüfung der Disruption des ORFs <i>NDI1</i>
<i>NDI1</i> plus 179rev	GCTGTGCAT TAGTCAAGC	Überprüfung der Disruption des ORFs <i>NDI1</i>

# MATERIALIEN

<i>NMA111</i> KAN 5fw	CGTAGAGTAC AGTAAAGGTT TTTTAGATCT ACTAATGACC ATATCGTTGA GCcagctgaa gcttcgtacg c	Amplifizierung der KAN-Kassette für die Disruption des ORFs <i>NMA111</i>
<i>NMA111</i> KAN 3rev	CTATTTTTCa CTTTGGCTGT TGCCGGTAAA TTCCTTTTCA ATCCATTTGT GCGcctatage ccactagtgg atct	Amplifizierung der KAN-Kassette für die Disruption des ORFs <i>NMA111</i>
<i>NMA111</i> minus 204fw	CCATTATTAG ACGCCATCTC AGCG	Überprüfung der Disruption des ORFs <i>NMA111</i>
<i>NMA111</i> plus 3162rev	CGTCAGGCGC TTGCAACCAT CTCG	Überprüfung der Disruption des ORFs <i>NMA111</i>
<i>OST2</i> 5' HindIII	CCGAAGCTTA TGGCAAAAGC ACC	Amplifizierung des ORFs <i>MGM1</i> für Überexpression
<i>OST2</i> 3' BamHI + STOP	CGCGGATCCT CAATTTATAA AATG	Amplifizierung des ORFs <i>MGM1</i> für Überexpression in <i>pVT100U</i>
<i>OST2</i> 3' BamHI - STOP	CGCGGATCCA TTTATAAAAT GTAAAC	Amplifizierung des ORFs <i>MGM1</i> für Überexpression in <i>pVT100ZZ</i>
<i>PCP1</i> KAN 5fw	CGACTGAAAA GGGTACAGCT TTCGCAACTG ACATATACAG ACAGTAAAA GTAATAAATT GCcagctgaa gcttcgtacg c	Amplifizierung der KAN-Kassette für die Disruption des ORFs <i>PCP1</i>
<i>PCP1</i> KAN 3rev	CCACGATAAG GCTGAAATAT TTTCAAATG CATAAATAAG ATTAAGTACA TAGAAGACAT AGCgcatage ccactagtgg atct	Amplifizierung der KAN-Kassette für die Disruption des ORFs <i>PCP1</i>
<i>PCP1</i> minus 173fw	CCTCATATAA CTCTCATAAA TGC	Überprüfung der Disruption des ORFs <i>PCP1</i>
<i>PCP1</i> plus 1199rev	GCTCTATTCT ATATATTCTT TTGC	Überprüfung der Disruption des ORFs <i>PCP1</i>
<i>QRI7</i> KAN 5fw	GCATCTTCAT TGC GCGATGA TTAATTGACAA TGAAATTAAA GCAAACAGCG ATTCTCAAGC cagctgaage ttctgacgc	Amplifizierung der KAN-Kassette für die Disruption des ORFs <i>QRI7</i>
<i>QRI7</i> KAN 3rev	CGAAAACTAA TAAAGAAATA CAACATCACT TCACCATTCT TAGACTAACA GCGATAGAGC gcatagccac tagtgatct	Amplifizierung der KAN-Kassette für die Disruption des ORFs <i>QRI7</i>
<i>QRI7</i> minus 130fw	GCTCTGCCAA TGGAAAGAGT GG	Überprüfung der Disruption des ORFs <i>QRI7</i>
<i>QRI7</i> plus 1449rev	CCACAATTAA GATAAAACAA AGC	Überprüfung der Disruption des ORFs <i>QRI7</i>
<i>QRI7</i> PstI fw	TGCACTGCAG ATGATATCAA TAAAAGG	Amplifizierung des ORFs <i>QRI7</i> für Überexpression
<i>QRI7</i> BamHI rev + Stop	CGCGGATCCT CATAGCTGGT CCGTTC	Amplifizierung des ORFs <i>QRI7</i> für Überexpression in <i>pVT100U</i>
<i>QRI7</i> BamHI rev - Stop	CGCGGATCCT AGCTGGTCCG TTCTCC	Amplifizierung des ORFs <i>QRI7</i> für Überexpression in <i>pVT100ZZ</i>
<i>UTH1</i> KAN 5fw	CCAACTACTA GTCCTTCCT TAAACAAAAA TTTACCCTCC CTTAATTTT CAAGAAATTC cagctgaaget tctgacgc	Amplifizierung der KAN-Kassette für die Disruption des ORFs <i>UTH1</i>
<i>UTH1</i> KAN 3rev	CCATAAAATG AACGGAGTAA AAAAAGTACT AGCAAAAGCT TATTTGCAAT ATTCAAGGgc atagcccat agtgatct	Amplifizierung der KAN-Kassette für die Disruption des ORFs <i>UTH1</i>
<i>UTH1</i> minus 193fw	GCAATTTACG CTCCTTTCAT CG	Überprüfung der Disruption des ORFs <i>UTH1</i>
<i>UTH1</i> plus 1227rev	GGGATAGTAC AAAGGACTGT G	Überprüfung der Disruption des ORFs <i>UTH1</i>
<i>YCA1</i> KAN 5fw	GCGTCCGGGT AATAACAAC ATTGAAAAAG CATGGCTTCG CATTAAATAGG AGCCcagctg aagcttgta cgc	Amplifizierung der KAN-Kassette für die Disruption des ORFs <i>YCA1</i>
<i>YCA1</i> KAN 3rev	CTACATAATA AATTGCAGAT TTACGTCAAT AGGGTGTGAC GATGATAATT GTGGgcatag cccactagt gatct	Amplifizierung der KAN-Kassette für die Disruption des ORFs <i>YCA1</i>
<i>YCA1</i> minus 196fw	CGTCTATACA TTATTGTGGC	Überprüfung der Disruption des ORFs <i>YCA1</i>
<i>YCA1</i> plus 1500rev	GCCTATTCCC TATATATCTT TGCC	Überprüfung der Disruption des ORFs <i>YCA1</i>

<i>YEp352 Reversal</i>	ACTTTATGCT TCCGGCTCG	Identifizierung der positiven Klone der Genbanktrafo
<i>YEp352 Universal</i>	GTTTTCCCAG TCACGAC	Identifizierung der positiven Klone der Genbanktrafo
<i>YET2 KAN 5fw</i>	CGCTGAGTGT TCGTTGGAGC ATGAATTATG TGAATAGAAA AATACTAAGC AAAATTTCAA AGTCGcagct gaagcttcgt acgc	Amplifizierung der KAN-Kassette für die Disruption des ORFs <i>YET2</i>
<i>YET2 KAN 3rev</i>	CCTTTTAAAA TTTCTTCTTC TGCAATTCCT CTAAATATTT TTGCTTTCGT CTTAACTTTT CCgcatagcc cactagtggg tet	Amplifizierung der KAN-Kassette für die Disruption des ORFs <i>YET2</i>
<i>YET2 minus 182fw</i>	GGCTTGTGTC AATTAGGC	Überprüfung der Disruption des ORFs <i>YET2</i>
<i>YET2 plus 622rev</i>	GTGGTCTTCA GGTATTCC	Überprüfung der Disruption des ORFs <i>YET2</i>
<i>YET2 5' HindIII</i>	CCGAAGCTTA TGGGTGTTTA TTTGG	Amplifizierung des ORFs <i>YET2</i> für Überexpression
<i>YET2 3' BamHI plus Stop</i>	CGCGGATCCT TAAAATTTCT TCTTC	Amplifizierung des ORFs <i>YET2</i> für Überexpression
<i>YET2 3' BamHI minus Stop</i>	CGCGGATCCA AATTCTTCT TCTGC	Amplifizierung des ORFs <i>YET2</i> für Überexpression
<i>YME1 KAN 5fw</i>	GCTTAAAGGA TAAACAGGAT TTTATTGAAG CAATTTTAA TTATAATACA TTGTGGATAG AACGcagctg aagcttcgta cgc	Amplifizierung der KAN-Kassette für die Disruption des ORFs <i>YME1</i>
<i>YME1 KAN 3rev</i>	TCATGCATTT AACATTGTAG GAATTTGGG TTTATCATCG CCTATATCTT TACGgcatag cccactagtg gatct	Amplifizierung der KAN-Kassette für die Disruption des ORFs <i>YME1</i>
<i>YME1 minus 182fw</i>	GCCACCTTTT TCTATCAGCA TCGG	Überprüfung der Disruption des ORFs <i>YME1</i>
<i>YME1 plus 622rev</i>	CGAATAATCT GAAGTTTCAA GCTGACC	Überprüfung der Disruption des ORFs <i>YME1</i>

**Tabelle IV.6: Verwendete Oligonukleotide.**

## **V. Methoden**

### **V.1 Anzuchtbedingungen, Medien und Dauerkulturen**

Für die Herstellung aller Medien/Agar wurde deionisiertes Wasser verwendet. Zur Sterilisation wurden alle Medien/Agar für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

#### **V.1.1 *E. coli***

Die *E. coli* Zellen wurden bei 37 °C in LB bzw. 2TY-Flüssigmedium (Luftschüttler) oder auf Kulturplatten mit LB bzw. 2TY-Agar angezogen.

**LB-Medium/Agar:** 1% Bacto Trypton, 0,5% Yeast Extract, 0,5% NaCl, +/- 1,8% Agar

**2TY-Medium/Agar:** 1,6% Bacto Trypton, 1,0% Yeast Extract, 0,5% NaCl, +/- 1,8% Agar

Zur Selektion auf Plasmide, die ein Ampicillin-Resistenzgen tragen, wurde dem autoklavierten Medium/Agar Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml (sterile Stammlösung 100 mg/ml in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>) zugesetzt.

#### **Dauerkulturen**

Für *E. coli* Dauerkulturen wurde der entsprechende Klon in 5 ml LB-Medium (bei Ampicillin-resistenz mit Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin) in 13 ml Falcon-Röhrchen angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Luftschüttler inkubiert. Am Tag darauf wurden die Zellen 5 min bei 1.600 g abzentrifugiert, in 0,5 ml LB-Medium und 0,5 ml 87% sterilem Glycerin resuspendiert, in ein Schraubdeckelgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

#### **V.1.2 *Saccharomyces cerevisiae***

*Saccharomyces cerevisiae* Zellen wurden, falls nicht anders beschrieben, bei 25 °C und 270 rpm im Wasserbadschüttler in YPD-Vollmedium bzw. im 25 °C Inkubatorschrank auf YPD-Vollmedium Agarplatten angezogen.

Um positive Hefeklonen nach genomischer Disruption mit einer KAN-Kassette zu selektionieren wurde dem YPD-Agar nach dem Autoklavieren 266 µg/ml G418-Sulfat, ein Kanamycinderivat, zugesetzt (sterile Stammlösung 266 mg/ml in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>).

Zur Induktion der GAL-10 Promotoren wurde dem Vollmedium 2% D-Galaktose anstelle von 2% D-Glukose zugesetzt.

**YPD-Medium/Agar:** 1% Yeast Extract (w/v), 2% Bacto Peptone (w/v), 2% Glukose (w/v), +/- 1,8% Agar

**YPE-Medium/Agar:** 1% Yeast Extract (w/v), 2% Bacto Peptone (w/v), 2% Ethanol (w/v) (wurde nach dem Autoklavieren dem stark abgekühlten Agar zugesetzt), +/- 1,8% Agar

**YPG-Medium/Agar:** 1% Yeast Extract (w/v), 2% Bacto Peptone (w/v), 3% Glycerin, +/- 1,8% Agar

**YPD-Medium mit Essigsäure (pH 3):** Der pH-Wert wurde mit rauchender HCl (12,67 M) vor dem Autoklavieren des Mediums auf 3 eingestellt, die benötigte Essigsäurekonzentration nach dem Autoklavieren mit einer 17,5 M Essigsäurestamm-lösung.

Zur Selektion auf Hefestämme mit Auxotrophiemarkern wurde dem synthetischen Vollmedium/Agar (CM) Dropout-Medium zugesetzt, in dem diejenige Aminosäure fehlte, deren Markergen für die Selektion in Hefe auf dem Plasmid enthalten war. Falls dem CM-Medium kein Dropout-Medium zugesetzt worden war (radioaktive Markierung der CPY), wurden die benötigten Aminosäuren, abhängig vom genetischen Hintergrund des verwendeten Stammes, in den unten aufgeführten Konzentrationen zugesetzt.

**Synthetisches Vollmedium (CM):** 0,67% Yeast Nitrogen Base (w/v), 2% D-Glukose (w/v), 0,08% drop out Medium (w/v), +/- 1,8% Agar

**Zugesetzte Aminosäuren:** 30 mg/l Adenin, 20 mg/l Histidin, 20 mg/l Leucin, 30 mg/l Tryptophan, 20 mg/l Uracil

Zur Kultivierung der Hefestämme mit einem Uracil Auxotrophiemarker wurde neben dem oben genannten CM -URA Minimalmedium auch das so genannte „Casamino Acids“ (CAA) Medium verwendet. Dieses enthielt ebenso wie das CM -URA Minimalmedium kein Uracil, wobei weitere Aminosäuren und Ionen in höherer Konzentration vorhanden waren, was zu einem schnelleren Wachstum der Kulturen führte.

**CAA-Medium:** 0,67% Yeast Nitrogen Base (w/v), 2% D-Glukose (w/v), 0,5% Casamino Acids (w/v), 30 mg/l Tryptophan, 20 mg/l Tyrosin, +/- 1,8% Agar

### Dauerkulturen

Für *S. cerevisiae* Dauerkulturen wurde ein Klon auf der entsprechenden Kulturplatte ausgestrichen. Nach zwei bis drei Tagen Inkubation bei 25 °C im Inkubatorschrank wurde von dieser Platte möglichst viel Material abgenommen und in 1 ml steriler 15%iger Glycerinlösung in Schraubdeckelgefäßen resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

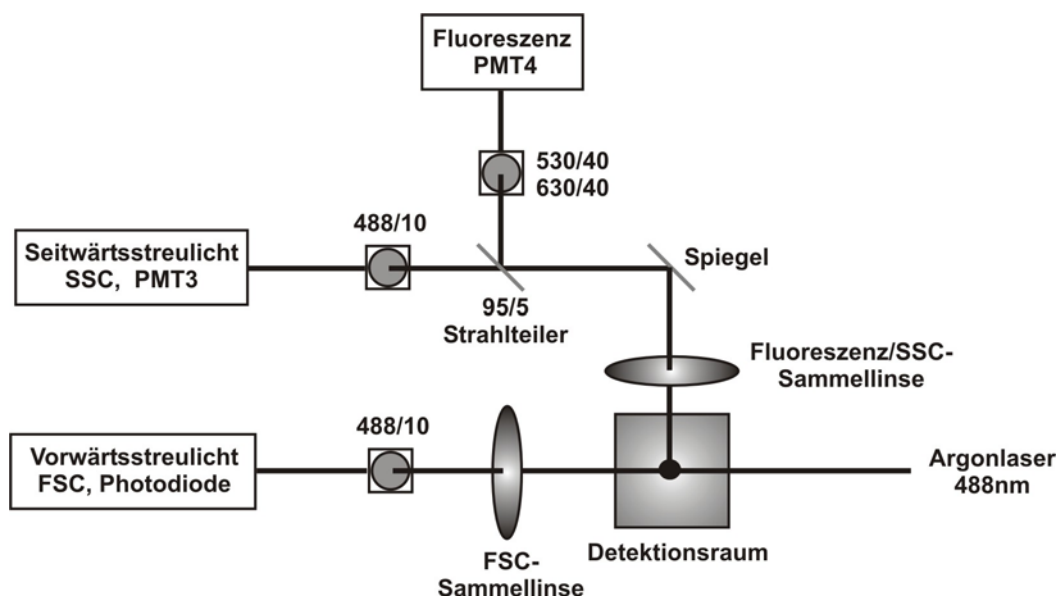
## V.2 Zellbiologische Methoden

### V.2.1 Theoretische Grundlagen

#### V.2.1.1 Durchflußzytometrie und FACS-Analyse

Durchflußzytometrie und FACS-Analyse („fluorescence activated cell sorting“) sind Analysetechniken, die vor allem in der zellbiologischen und medizinischen Forschung immer mehr Verwendung finden. Während in der Durchflußzytometrie Zellen anhand der Emission bzw. Streuung von optischen Signalen seitens der Zelle untersucht werden, können bei FACS-Analysen diese Zellen zusätzlich sortiert werden. Diese Methoden erlauben es, mikroskopisch kleine Partikel, wie Einzelzellen oder Bakterien, zu sortieren und deren physikalische und molekulare Eigenschaften zu untersuchen. Mittels Durchflußzytometrie können unter anderem Volumen und morphologische Komplexität von Zellen, Zellzyklusstadien, antikörpergebundene Zellkompartimente und apoptotische Merkmale von Zellen untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde das FACS-Gerät MoFlo der Firma Cytomation GmbH (Freiburg) verwendet.

Das Messprinzip beruht auf der Methode der hydrodynamischen Fokussierung, d.h. die zu vermessenden Zellen werden mittels eines Hüllstroms (bestehend aus entgastem PBS), der mit höherer Geschwindigkeit durch die Kapillare geschleust wird als die zu analysierenden Zellen, in einer laminaren Strömung zentriert. Die Zellen werden mit hoher Geschwindigkeit (25 m/s) über eine Düse (50µm Durchmesser) durch den Argonlaserstrahl geleitet, wobei sie das Laserlicht in verschiedene Richtungen streuen und nach Fluoreszenzmarkierung zusätzlich Fluoreszenzlicht emittieren. Die



**Abb. V.1: Schematische Darstellung des optischen Systems des FACS MoFlo.**

PMT: Photomultiplier Tube, Bezeichnung der Bandpassfilter z.B. 488/10: dieser Filter ist für Licht der Wellenlänge 488 +/- 10 nm durchlässig.

Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffs werden durch den wassergekühlten Argonlaser (488 nm, Leistung 90 mW) auf ein höheres Energieniveau gehoben. Kurz darauf fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie in Form von Photonen wieder auf ihr Ausgangsenergieniveau zurück, wobei sich die durch einen Photodetektor registrierte Konzentration an Photonen direkt proportional zur Menge an detektiertem Farbstoff verhält. Des Weiteren können Zellen aufgrund des von ihnen emittierten Streulichts in Größe, Oberflächenbeschaffenheit und intrazelluläre Bestandteile voneinander unterschieden werden. Das Vorwärtstreulicht FSC („forward scatter light“), das in einem Winkel zwischen ca. 2° und 15° zur Strahlenrichtung des Lasers abgegriffen wird, gibt Informationen über Zellvolumen und Zellgröße, das Seitwärtstreulicht SSC („side scatter light“), das etwa im 90° Winkel abgegriffen wird, über intrazelluläre Substanzen und Oberflächenstrukturen der Zellen (Abb. V.1). Die Umwandlung des optischen Signals in ein digitales erfolgt für das SSC und die Fluoreszenz durch Photodetektoren, so genannte Photomultiplier Tubes (PMTs), für das FSC durch eine Photodiode. Nachdem der blaue Laser im Detektionsraum auf die Probe trifft, wird das FSC an der Photodiode nach passieren eines 488/10 Bandpassfilters detektiert, das SSC und das Fluoreszenzlicht wird in

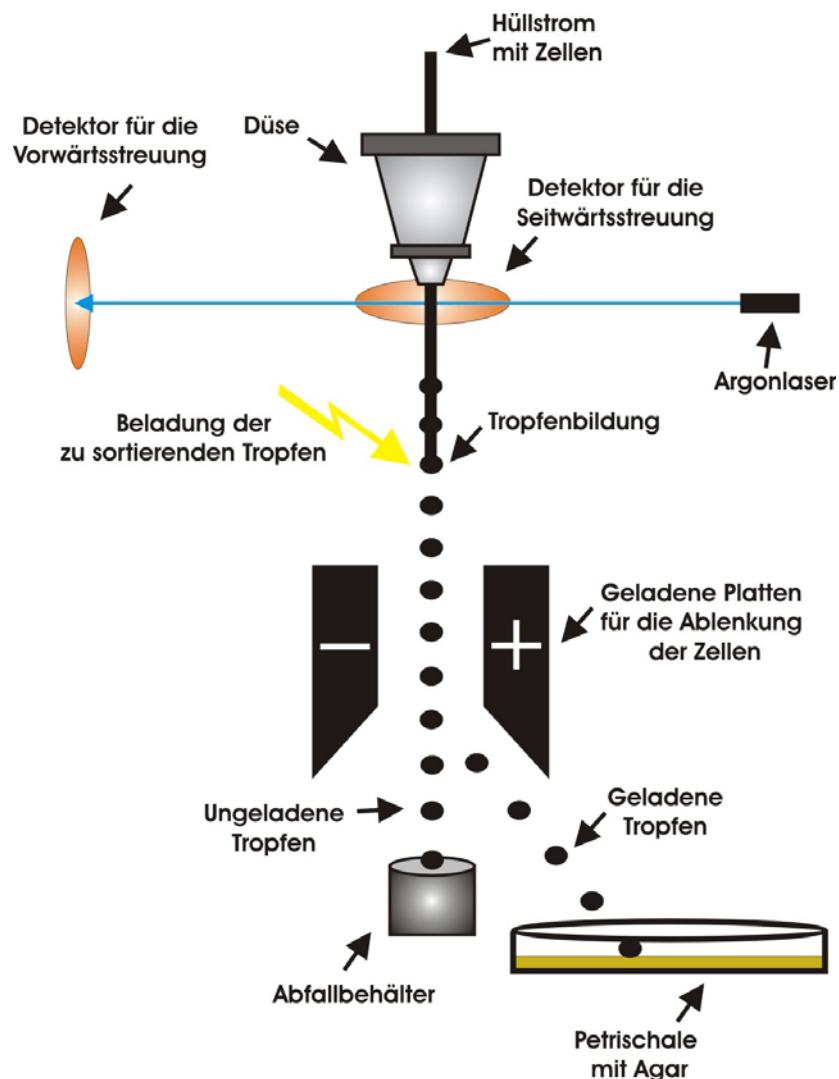


Abb. V.2: Prinzip des Durchflußzytometers MoFlo der Firma Cytomation GmbH.

der Fluoreszenzsammellinse gebündelt und durch einen Spiegel auf einen Strahlenteiler (95/5 BS („beam splitter“)) geleitet. 95% des Lichts bzw. der Fluoreszenz werden auf einen Bandpassfilter geleitet, dessen Wellenlängentransmission vom Fluoreszenzfarbstoff abhängig ist (530/40 für Dihydrorhodamin 123, D<sub>2</sub>R und FITC-Konjugate, 630/40 für Propidiumjodid), und der transmittierte Anteil (Fluoreszenz) am PMT4 detektiert. 5% des Lichts bzw. der Fluoreszenz durchdringen den Strahlenteiler und treffen nach der Passage des 488/10 Bandpassfilters auf den PMT3, wo das SSC-Signal abgegriffen wird. Neben der Durchführung von FACS-Analysen können mit dem MoFlo Gerät der Firma Cytomation auch Einzelzellen sortiert werden. Hierzu wird der Flüssigkeitsstrom bestehend aus Hüllstrom (dieser wird mit einem Druck von ca. 60 psi zur Düse transportiert) und Probe (Druck des Hüllstroms + 0,2 psi) durch Vibration der Düse (Frequenz ca. 100 kHz) in einen Tröpfchenstrom zerteilt, wobei einzelne Zellen auf die Tropfen verteilt werden (Abb. V.2). Die gebildeten Tropfen, die eine zu sortierende Zelle enthalten (diese Auswahl wird mittels des Software Programms Summit v3.1 getroffen), werden mit Ladung versehen (+/- 190 Volt). Beim Passieren der elektrisch geladenen Platten (3.000 Volt) werden die Zellen entsprechend ihrer Ladung nach links (+190 Volt) oder rechts (-190 Volt) in Probenröhrchen abgelenkt oder, im Falle der Überlebensrateanalyse, direkt auf Petrischalen plattiert. Ungeladene Tropfen, die keine Zelle bzw. eine Zelle enthalten, die nicht die mittels der Software ausgewählten Eigenschaften aufzeigt, können das elektrische Feld passieren ohne abgelenkt zu werden. Diese werden von einem Saugrüssel aufgenommen und einem Abfallbehälter zugeführt.

#### **V.2.1.2 Konfokale Mikroskopie**

Konfokale Laserscanning Mikroskopie wurde am LSM 510-META der Firma Carl Zeiss (Jena, Germany) durchgeführt. Die Fluoreszenzsignale von FITC-VAD-FMK, DHR123, D<sub>2</sub>R und GFP wurden nach Anregung bei 488 nm (Argonlaser) mit einem 505-550 nm Bandpassfilter detektiert. Für PI- und RFP-Signale wurde nach Anregung bei 543 nm (HeNe-Laser) ein 585 nm Langpassfilter verwendet. Um „cross-talk“ zwischen den unterschiedlichen Fluoreszenzkanälen zu vermeiden, wurden co-gefärbte Proben sequentiell gescannt. Hiervon ausgenommen war die Untersuchung der Qri7p Lokalisation (II.2.3.2, Abb. II.19). Hier konnte aufgrund intrazellulärer Bewegung keine optimale Co-Lokalisation bei sequentieller Scannung zwischen mt-GFP und *QRI7*-RFP detektiert werden. Deshalb erfolgte die Anregung der Fluorophore gleichzeitig, wobei zuvor sichergestellt worden war, dass kein „cross-talk“ auftrat.

#### **V.2.2 Anzucht und Behandlung der Zellen für die Durchflußzytometrie, FACS-Analyse und konfokale Mikroskopie**

Aus einer frischen Vorkultur wurde eine frische Übernachtskultur in 25 ml Medium (falls nicht anders angegeben wurden die Stämme in YPD angeimpft) in einem 100 ml Erlenmeyerkolben bei 270 rpm in einem Wasserbadschüttler bei 25 °C (Wildtyp und Mutanten) auf eine optische Dichte von  $2 \times 10^6$



Zellen/ml angezogen. Anschließend wurden die Kulturen geteilt und wie in Tabelle V.1 beschrieben mit den unterschiedlichen Additiven behandelt. Anschließend wurden die Kulturen bei 25 °C oder 37 °C weiter inkubiert. Alle Zusatzstoffe wurden zum Zeitpunkt des „Temperaturshifts“ in der angegebenen Endkonzentration zur Kultur zugegeben. Ausgenommen hiervon war zVAD-FMK, hier wurden der Kultur 10 µM zum Zeitpunkt des „ts-Shifts“ und 10 µM 30 min vor dem Ernten der Zellen zugesetzt.

Additive	Stammkonzentration	Endkonzentration
Cycloheximid (CH)	50 mg/ml in Ethanol	50 µg/ml
(L-Aspartat) <sub>2</sub> -Rhodamin (D <sub>2</sub> R)	25 mM Stammlösung in Ethanol/DMSO 2:1	0,2 mM
N-Acetylcystein (NAC)	500 mM in H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	10 mM
Propidiumjodid (PI)	50 µg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	50 ng/ml
reduziertes Glutathion (GSH)	200 mM in H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> (frisch angesetzt)	5 mM, 10 mM
Tunicamycin (TM)	10 mg/ml in DMSO	10 µg/ml
zVAD-FMK	1 mM in DMSO	20 µM

**Tabelle V.1: Stamm- und Endkonzentrationen der Additiva.**

### **V.2.3 Färbung und Vorbereitung der Zellen für Untersuchungen mittels**

#### **Durchflußzytometrie, FACS-Analyse und konfokaler Mikroskopie**

Für den Nachweis von Caspaseaktivität, ROS-Produktion und PI-Färbung wurden 5x10<sup>6</sup> Zellen geerntet, mit 1 ml filtrierter PBS-Lösung gewaschen und soweit nicht anders beschrieben in filtrierter PBS-Lösung für die Färbung inkubiert.

Um Caspaseaktivität nachzuweisen, wurden die gewaschenen Zellen für 20 min bei 25 °C in 200 µl 10 µM FITC-VAD-FMK (5 mM Stammlösung) Färbelösung oder für 30 min bei 30 °C in 250 µl YPD 0,2 mM D<sub>2</sub>R (25 mM Stammlösung in Ethanol/DMSO 2:1) bei 300 rpm im Dunkeln inkubiert. Intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wurden durch die Zugabe von 5 µg/ml DHR123 und H<sub>2</sub>DCFDA (Stammlösungen 2,5 mg/ml in Ethanol) 2 h vor dem Ernten der inkubierenden Kultur detektiert. Zellintegrität wurde durch zusätzliches Färben der Zellen mit 50 ng/ml Propidiumjodid (50 µg/ml Stammlösung in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>) in 200 µl PBS nachgewiesen. Nach den Färbungen wurden die Zellen zweimal mit filtrierter PBS-Lösung gewaschen und in 1 ml filtrierter PBS-Lösung (Durchflußzytometrie und FACS-Analyse) bzw. nach kurzem Zentrifugieren in 30 µl PBS-Lösung (konfokale Mikroskopie) aufgenommen.

Da die N-Glykosylierungsmutante *wbp1-1* nach dem Umsetzen von der permissiven auf die restriktive Temperatur zu Klumpen begann, was ebenfalls für Wildtypzellen nach Inkubation mit Tunicamycin zutraf, wurden die Zellen vor der Analyse im MoFlo Cytomation zur Vereinzelung für 10 s im Ultraschallwasserbad behandelt. Hierbei wurden diejenigen Zellen, die für die Durchflußzytometrie vorbereitet wurden, in 10 ml Glasfiolax-Röhrchen ultraschallbehandelt, Zellen für FACS-Analysen in 5 ml Polypropylen-Röhrchen (MoFlo Probenröhrchen), um eine sanftere Behandlung der Zellen mit

Ultraschall zu gewährleisten (die Ultraschallbehandlung im Polypropylenröhrchen zeigte keinerlei Einfluss auf die Überlebensrate der Zellen). Für die Analyse der Überlebensrate wurden 56 Einzelzellen mit dem MoFlo Zellsorter direkt auf entsprechende Agar-Platten sortiert. Um eine statistische Auswertung zu gewährleisten wurden für jeden Messpunkt 4 Platten á 56 Zellen (224 Zellen) sortiert und das Wachstum der Zellen nach 3 bis 4 Tagen Inkubation bei 25 °C detektiert. Zur Fixierung der Zellen für die konfokale Mikroskopie wurden diese mit 1%igen Agaroseblöckchen immobilisiert.

### **V.2.4 Kulturvorbereitung für Wachstumstests (Tüpfeltest)**

Eine Übernachtskultur wurde auf eine OD<sub>600</sub> von 1 angeimpft. Von dieser wurden 1 OD Zellen geerntet (bei verklumpenden Zellen wurden diese vor der OD-Messung in Glasfiolax-Röhrchen im Ultraschallwasserbad vereinzelt; diese Zellen wurden jedoch nicht für den Wachstumstest verwendet, sondern es wurden anhand der gemessenen OD<sub>600</sub> unbehandelte Zellen geerntet) und in 1 ml YPD aufgenommen. Anschließend wurden 1:10er Verdünnungen von 10<sup>-1</sup> bis 10<sup>-5</sup> hergestellt, von denen je 3 µl auf die entsprechenden Platten pipettiert wurden.

## **V.3 Molekularbiologische Methoden**

### **V.3.1 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

#### **V.3.1.1 Analytischer Verdau**

Für den analytischen Verdau der aus *E. coli* isolierten Plasmide wurden 1 µl Plasmid-DNA, 1,5 µl des entsprechenden 10x Puffers von NEB, je 5 Units der Enzyme von NEB und gegebenenfalls 1% BSA eingesetzt, mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> auf 15 µl aufgefüllt und für 1 h bei 37 °C inkubiert.

#### **V.3.1.2 Präparativer Verdau (Insert, Vektoren)**

Für einen präparativen Verdau von Vektoren wurden zwischen 1,5-2 µg des Vektors, 6 µl des entsprechenden 10x Puffers von NEB, je 50 Units der Enzyme von NEB und gegebenenfalls 1% BSA eingesetzt, mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> auf 60 µl aufgefüllt und für 4 h bei 37 °C inkubiert.

Für einen präparativen Verdau von Inserts wurden zwischen 1,5-2,5 µg des Inserts, 10 µl des entsprechenden 10x Puffers von NEB, je 60 Units der Enzyme von NEB und gegebenenfalls 1% BSA eingesetzt, mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> auf 100 µl aufgefüllt und für 4 h bei 37 °C inkubiert.

### **V.3.2 Subklonierung in pUC19 und pBS**

Für die Subklonierung wurden unabhängig von der DNA-Konzentration 4 µl des mit der Phusion Polymerase amplifizierten PCR-Ansatzes (50 µl) eingesetzt. Dazu wurden 1 µl (ca. 300-500 ng) pUC19 bzw. pBS, 1 µl 10x T4-DNA-Ligasepuffer, 1,5 µl T4-DNA-Ligase, 0,5 µl SmaI (pUC19) bzw. 0,5 µl EcoRV (pBS, hier wurde zusätzlich 1 µl NaCl aus 1 M Stammlösung zugegeben) und 1 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gegeben. Der Ansatz wurde kurz durchmischt und für 4-5 h bei 22 °C inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme für 10 min bei 65 °C deaktiviert. Es wurden 0,5 µl SmaI (pUC19) bzw. 0,5 µl EcoRV (pBS) zugegeben und der Vektor für 30 min bei 37 °C geschnitten. Dieser Ansatz wurde vollständig in die Transformation in *E. coli* eingesetzt.

### **V.3.3 Herstellung chemisch kompetenter Zellen**

*E. coli* Zellen wurden aus einer Dauerkultur auf einer LB-Platte (ohne Antibiotikum) ausgestrichen und ÜN bei 37 °C inkubiert. Tags darauf wurden von einer Einzelkolonie 5 ml LB-Medium angeimpft und ÜN bei 37 °C kultiviert. Von dieser ÜN-Kultur wurde 1 ml zu 100 ml auf 37 °C vorgewärmtes LB-Medium gegeben und solange bei 37 °C inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,8 erreicht worden war. Anschließend wurden die Zellen in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und 20 min auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden für 5 min bei 1.200 g und 4 °C abzentrifugiert und das Pellet in 5 ml TSS-Medium resuspendiert. Darauf wurden die Zellen in 100 µl und 200 µl Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

**TSS-Medium:** 85% LB-Medium, 10% PEG4000, 5% DMSO, 50 mM MgCl<sub>2</sub>

**V.3.4 Transformation und Selektion in *E. coli***

Chemisch kompetente Zellen wurden von -80 °C auf Eis aufgetaut (100 µl/Transformation), die zu transformierende DNA zugegeben und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte für 45 s bei 42 °C ein Hitzeschock im Wasserbad. Die Zellen wurden anschließend in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37 °C im 13 ml Falcon-Röhrchen inkubiert. Davon wurden 100 µl auf LB-Amp-Platten ausplattiert, der Rest der Zellsuspension wurde kurz abzentrifugiert, der größte Teil des Überstands abgegossen und die restliche Suspension (ca. 80 µl) ausplattiert. Positive Transformanten konnten durch ihre Resistenz gegenüber Ampicillin selektiert werden. Um eine zusätzliche Reduktion an falsch positiven Klonen zu erzielen, wurde das so genannte „Blau-Weiß-Screening“ angewendet. Hierfür muss die multiple Klonierungsstelle der Vektoren am Anfang eines modifizierten *lacZ* Gens liegen, das nur noch für den C-terminalen Teil der  $\beta$ -Galaktosidase kodiert. Falls keine Fremd-DNA in den „Shuttle Vector“ inseriert und nur der Leervektor transformiert worden war, kam es durch Induktion der Expression durch das Laktose-Analogon IPTG zur Bildung einer verkürzten  $\beta$ -Galaktosidase. Falls für die Klonierung ein *E. coli* Stamm verwendet wurde, der die N-terminale  $\beta$ -Galaktosidase Domäne exprimierte, kam es zur Komplementation beider Domänen, was zu einem funktionellen Enzym führte. Bei Inkubation von *E. coli* auf Agar-Platten (mit Antibiotikum) mit X-Gal wurde dieses durch das Enzym zu einem blauen Farbstoff umgewandelt. Falls jedoch das DNA-Fragment in die Klonierungsstelle eingefügt wurde, war die  $\beta$ -Galaktosidase nicht funktionell und konnte somit X-Gal nicht umsetzen. Diese Kolonien mit rekombinantem Vektor blieben weiß.

**X-Gal:** 40 µl pro Platte (Stammlösung 2% in DMF)

**IPTG:** 8 µl pro Platte (Stammlösung 100 mM in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>)

Vor dem Ausplattieren der Additive wurden diese in einem Eppendorf Reaktionsgefäß gut vermischt.

**V.3.5 Plasmidisolierung aus *E. coli***

Tags zuvor wurden 2 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin mit einem Klon angeimpft. Die Übernachtskultur wurde geerntet, in 100 µl kalter Lösung 1 aufgenommen und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl frisch hergestellter Lösung 2 wurden die Gefäße zweimal gestürzt und für 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 150 µl Lösung 3 zugegeben, kurz gevortext und für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Nach 5 min Zentrifugieren wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zu diesem wurden 800 µl Ethanol p.a. für die Fällung zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde für 5 min maximal abzentrifugiert und das Pellet mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Das verbleibende Pellet wurde nun für etwa 10 min in der Speed-vac getrocknet, anschließend in 20 µl TE/RNase aufgenommen und 15-30 min bei Raumtemperatur geschüttelt (Ish-Horowicz und Burke, 1981).

1,5 ml eines „Miniprep“ ergaben etwa 0,25 µg/µl des Plasmids (dies entsprach etwa einer Gesamtmenge an Plasmid von 5 µg).

**Lösung 1:** 50 mM Glukose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl (pH 8,0)

**Lösung 2:** 2 ml 1 M NaOH, 1 ml 10% SDS, 7 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

**Lösung 3:** 60 ml 5M KAc, 11,5 ml Eisessig, 28,5 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

Für die Sequenzierung wurde Plasmid-DNA aus *E. coli* mit dem Qiagen Miniprep Kit nach Vorschrift des Herstellers isoliert.

### **V.3.6 Amplifizierung der Hefegenbank**

Die in YEp352 klonierte Genbank wurde von Herrn Prof. M. Aeby (Institut für Mikrobiologie, ETH Zürich) zur Verfügung gestellt. Da keine Konzentrationsbestimmung der Genbank vorlag, wurde die Amplifizierung wie nachfolgend beschrieben durchgeführt. Die getrocknete Probe wurde in 10 µl 1x TE aufgenommen. Davon wurde 1 µl entnommen und mit 1xTE 1:30 verdünnt. Für die Elektroporation wurden 100 µl superkompetente *E. coli* Zellen (ElektroMAX™ DH10B™ Cells) für 5 min auf Eis aufgetaut und 30 µl entnommen (die restlichen Zellen wurden in Trockeneis schockgefroren und waren wieder zu verwenden). Dazu wurden 0,4 µl der verdünnten Genbank pipettiert, die Zellen und die DNA nach leichtem Durchmischen in 2 mm vorgekühlte Elektroporationsküvetten überführt und im Gene Pulser elektroporiert (Einstellungen: Spannung 2,5 KV, Kapazität 25 µFD, Widerstand 200 Ω). Anschließend wurde sofort 1 ml eiskaltes SOC-Medium zugegeben, die Zellen für 1 h bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert, mit weiteren 2 ml warmen SOC-Medium verdünnt und je 100 µl auf einer LB-AMP Platte ausgebracht. Nach einem Tag Inkubation bei 37 °C waren keine Einzelklone sondern ein Rasen zu sehen. Dieser wurde mit einem breiten, sterilen Spatel abgekratzt, verbleibende Zellen mit TE (pH 8,0) abgewaschen und mit dem Rest vereinigt. Nach Bestimmung des Nassgewichts (2,28 g) wurden die Plasmide mit dem Kit (Nucleobond PC 10000) isoliert (nach Vorschrift des Herstellers) und die Konzentration mit dem Photometer bei 260 nm/280 nm bestimmt.

**SOC-Medium:** 2% Bacto Trypton, 0,5% Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glukose

**TE:** 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA

### **V.3.7 Hefetransformation**

Für die Hefetransformation nach Schiestl und Gietz wurden je Transformation 10 OD einer logarithmischen Übernachtskultur (OD<sub>600</sub> zwischen 1-3) geerntet und mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gewaschen (Schiestl und Gietz, 1989). Nach einem weiteren Waschgang mit 1 ml 0,1 M TE/LiAc (pH 8,0) wurde das Pellet in 50 µl 0,1 M TE/LiAc resuspendiert. Zu dieser Suspension wurden nun 100 ng-1 µg des gereinigten PCR Produkts, 5 µl Lachssperm DNA (50 µg), die zuvor 5 min bei 95 °C inkubiert worden war, sowie 300 µl 40% PEG 4000 (in TE/LiAc) zugegeben, mit der Pipettenspitze vermischt, 30 min bei 30 °C und anschließend 15 min bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und in 200 µl Medium aufgenommen. Davon wurden 80 µl pro Platte ausplattiert.

Für die Disruption von Genen mit einer *KAN*-Kassette (Resistenzgen für G418 Sulfat) wurden 10 µg PCR Produkt der *KAN*-Kassette eingesetzt. Nach Inkubation bei 42 °C (siehe oben) wurde das Pellet in 1 ml YPD aufgenommen und 3-4 h bei 25 °C in einem 13 ml Falcon-Röhrchen inkubiert. Nach dieser Zwischeninkubation wurden die Zellen abzentrifugiert, in 200 µl TE (pH 8) aufgenommen, für die Selektion auf YPD-G418 Sulfat Platten ausplattiert und 3-4 Tage bei 25 °C inkubiert.

### **V.3.8 Transformation von *wbp1-1* mit der Genbank**

Die Hefetransformation wurde mit Abweichungen wie unter V.3.7 beschrieben durchgeführt. Für die Trafo wurden 80 ng und 160 ng der neu hergestellten Genbank eingesetzt. Die auf Petrischalen mit Minimalmedium ohne Uracil ausplattierten Zellen wurden für 4-10 Tage bei 31 °C inkubiert und die während dieser Zeit hochgewachsenen Klone für die spätere Weiterverarbeitung auf Platten mit Minimalmedium ohne Uracil kultiviert.

### **V.3.9 Isolierung genomischer DNA aus *S. cerevisiae***

Von einer stationären Hefekultur wurden 75-100 OD Zellen geerntet und 1x mit 0,5 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gewaschen. Zu dem Zellpellet wurden 0,2 ml Aufschlusspuffer, 0,2 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 und 0,3 g sterile Glasperlen (Ø 0,45-0,55 mm) gegeben, mit der Pipettenspitze gemischt und 4 min gevortext. Nach dem Aufschluss wurden 0,2 ml TE (pH 8,0) zugegeben und 5 min bei 16.000 g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase, in der die DNA enthalten war, wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 98% Ethanol (-20 °C) gefällt und erneut abzentrifugiert. Nach 10 min Trocknen in der Speed-vac wurde das Pellet in 0,4 ml TE/RNase (75 µg/ml) aufgenommen und 30 min bei 37 °C inkubiert, bevor die DNA durch Zugabe von 10 µl 4 M NH<sub>4</sub>Ac und 1 ml Ethanol p.a. (-20 °C) erneut gefällt wurde. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis wurde die DNA bei 4 °C 5 min abzentrifugiert, anschließend mit 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in der Speed-vac in 50 µl TE (pH 8,0) aufgenommen.

**Aufschlusspuffer:** 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% SDS, 2% Triton-X-100

**TE/RNase (20µg/ml):** 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA, 15 min bei 100 °C aufkochen, danach auf RT abkühlen lassen

### **V.3.10 Plasmidisolierung aus *S. cerevisiae***

Von einer stationären Hefekultur wurden 100 OD Zellen geerntet und mit 10 ml TE (pH 8,0) gewaschen. Das Pellet wurde in 200 µl Aufschlusspuffer aufgenommen und in ein Fiolaxglas mit 0,75 g Glasperlen (Ø 0,45-0,55 mm) überführt. Nach 1 min Vortexen wurde der Überstand mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgehoben und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Glasperlen wurden mit 200 µl Aufschlusspuffer gewaschen und die beiden Überstände vereinigt. Danach wurde ein Volumen Chloroform zugegeben, für 1 min gevortext und 5 min zentrifugiert. Die obere Phase

wurde in ein neues Eppendorfgefäß gegeben und wiederum mit einem Volumen Chloroform, wie oben beschrieben, vermischt (dieser Vorgang wurde insgesamt 3x wiederholt). Zum Überstand wurde ein Volumen CIA gegeben und 1 min gevortext, 4 min abzentrifugiert und die obere Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Dazu wurde 1/10 Volumen 3 M NaAc und 2,5 Volumen Ethanol p.a. (-20 °C) gegeben, gevortext und 20 min auf Eis inkubiert. Nach 5 min Zentrifugieren wurde das Pellet einmal mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen und in der Speed-vac getrocknet, bevor es in 50 µl TE/RNase (75 µg/ml) für 30 min bei 30 °C aufgenommen wurde.

**Aufschlusspuffer:** 1 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% SDS

**Chloroform:** Phenol: Chloroform 1:1, 0,05% p-Hydroxychinolin, Über Nacht mit 150 ml ANE-Puffer äquilibrieren

**ANE-Puffer:** 10 mM NaAc, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA

**CIA:** Chloroform:Isoamylalkohol 24:1

### **V.3.11 Plasmidisolierung aus *S. cerevisiae* (STET)**

Von einer stationären Hefekultur wurden 1,5 ml in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß geerntet und in 100 µl STET-Puffer aufgenommen. Zu der Suspension wurden 0,2 g Glasperlen (Ø 0,45-0,55 mm) gegeben und die Zellen für 20 s im Ribolyser (Stufe 5,5) aufgeschlossen. Anschließend wurden 100 µl STET-Puffer zugegeben, 3 min bei 95 °C im Wasserbad inkubiert und auf Eis abgekühlt. Die Zellfragmente wurden für 10 min bei 16.000 g und 4 °C abzentrifugiert. 100 µl des Überstands wurden in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß, in dem 50 µl 7,5 M NH<sub>4</sub>Ac vorgelegt waren, überführt und durch sanftes Vortexen gemischt. Nach Fällung für 1 h bei -20 °C wurde für 10 min bei 16.000 g und 4 °C zentrifugiert. Vom Überstand wurden 100 µl in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß, in dem 100 µl kaltes Ethanol vorgelegt war, überführt, gevortext und 10 min bei 16.000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, in der Speed-vac getrocknet und in 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> aufgenommen.

**STET-Puffer:** 8% Saccharose, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM EDTA, 5% Triton X-100

### **V.3.12 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die Amplifizierung von Genen aus genomischer DNA (nach Erlich, 1989) wurde mit dem Phusion High-Fidelity PCR Kit von Finnzymes nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Resistenzkassette gegen Kanamycin wurde mit der *Taq*-DNA-Polymerase von der Matrize pUG6 amplifiziert, wobei unabhängig von der Schmelztemperatur der Primer folgendes Zweistufenprotokoll verwendet wurde: Nach dem ersten Denaturierungsschritt für 3 min bei 94 °C wurde in 15 Zyklen für 30 s bei 94 °C denaturiert, 30 s bei 52 °C gebunden und 2 min bei 72 °C verlängert. In den folgenden 15 Zyklen wurde anstelle von 30 s bei 52 °C für 1 min bei 68 °C gebunden.

**Ansatz:** 10µl 10x Puffer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,1 µM je Primer, 5 Units *Taq*-DNA-Polymerase, 1 µl pUG 6, 76 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

## **V.4 Proteinbiochemische Methoden**

### **V.4.1 Zellaufschluss**

#### **V.4.1.1 Alkalische Lyse**

Von einer ÜN-Kultur wurden 10 OD Zellen ( $OD_{600}$  zwischen 1-3) geerntet, mit 1 ml  $H_2O_{dest}$  gewaschen, das Pellet in 150  $\mu$ l kaltem Lysepuffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 150  $\mu$ l 50% TCA (1:1 mit  $H_2O_{dest}$  verdünnt) zugegeben und der Ansatz weitere 10 min auf Eis inkubiert. Die gefällten Proteine wurden 10 min bei 16.000 g und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 0,5 ml 1 M Tris-Base (pH nicht eingestellt, ca. 10,8) überschichtet. Nach kurzem Zentrifugieren wurde das Pellet zweimal mit Aceton (-20 °C) gewaschen und danach in 100  $\mu$ l Lämmli-puffer A aufgenommen.

**Lysepuffer:** 1,85 M NaOH, 7,5% EtSH

**Laemmli A:** 625 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% SDS, 5% Glycerin, 0,7 M EtSH, 0,6% Bromphenolblaulösung

#### **V.4.1.2 Glasperlenaufschluss**

Eine ÜN-Kultur wurde auf eine  $OD_{600}$  zwischen 1-3 angeimpft. Davon wurden 30 OD Zellen geerntet, mit 1 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) gewaschen und in 300  $\mu$ l Aufschlusspuffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein Glasfiolax-Röhrchen mit 1,2 g Glasperlen ( $\varnothing$  0,45-0,55 mm) überführt und 10 min bei maximaler Drehzahl im Reagenzglasschüttler Vibrax-VXR bei 4 °C aufgeschlossen. Der Überstand wurde mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgehoben, die Glasperlen mit 200  $\mu$ l Aufschlusspuffer gewaschen und die Überstände in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vereinigt. Größere Zellfragmente und Zellwände wurden für 3 min bei 500 g und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde für 30 min bei 48.000 g zentrifugiert. Im Überstand befand sich die cytosolische Fraktion, im Pellet waren die Membranen enthalten, die für die Weiterverwendung in *in vitro* Experimenten in 60  $\mu$ l Membranaufnahmepuffer mittels pipette aufgenommen wurden. Für Analyse der Proteine mittels „Western Blot“ wurde die cytosolische Fraktion mit 1/6 Lämmli-puffer B versetzt, die Membranfraktion in Lämmli-puffer A (siehe V.4.1.1) aufgenommen.

**Aufschlusspuffer:** 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EtSH, 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidin

**Membranaufnahmepuffer:** 30 mM Tris-HCl (pH 7,5), 3 mM  $MgCl_2$ , 1 mM DTT, 35% Glycerin

**Laemmli B:** 250 mM Tris-HCl (pH 6,8), 12% SDS, 20% Glycerin, 2,8 M EtSH, 0,6% Bromphenolblaulösung



#### **V.4.1.3 Glasperlenaufschluss Merckenschlager (großer Maßstab)**

Eine ÜN-Kultur wurde in 4x 400 ml Medium in 1 l Kolben auf eine OD<sub>600</sub> zwischen 1-3 angeimpft, 10 min bei 4.000 g und 4 °C geerntet und zweimal mit 20 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) in 50 ml Falcon-Röhrchen gewaschen. Die Zellen wurden in Aufschlusspuffer resuspendiert, wobei pro g Nassgewicht der Zellen 1 ml Aufschlusspuffer verwendet wurde. Die Suspension wurde in das Merckenschlager-Aufschlußgefäß überführt, in dem sich pro g Nassgewicht 5 g Glasperlen (Ø 0,45-0,55 mm) befanden. Der Aufschluss der Zellen wurde im Merckenschlager unter Kühlung mit CO<sub>2</sub> durchgeführt und anschließend mikroskopisch kontrolliert. Die Zellsuspension wurde von den Glasperlen mit Hilfe eines Büchnertrichters (Filterdurchmesser 70 nm) getrennt, wobei die Glasperlen zweimal mit je 10 ml Aufschlusspuffer gewaschen wurden. Größere Zellfragmente wurden für 5 min bei 500 g und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand in ein neues Röhrchen überführt und für 30 min bei 20.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in 5 ml Aufschlusspuffer resuspendiert und der letzte Zentrifugationsschritt wiederholt. Der Überstand wurde wieder verworfen, das Pellet je nach gewünschter Proteinkonzentration in Membranaufnahmepuffer resuspendiert und mit einem Potter homogenisiert. Die Membranen konnten in diesem Zustand bei -80 °C gelagert werden.

**Aufschlusspuffer:** 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EtSH, 1 mM PMSF (ohne PMSF für Kex1p Aktivitätstest), 1 mM Benzamidin, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5% Glycerin

**Membranaufnahmepuffer:** siehe V.4.1.2

#### **V.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Proteinkonzentration wurde nach Angaben des Herstellers mit dem Bradford-Reagens von Interchim bestimmt. Die Messungen wurden im Eppendorf Biophotometer, das eine programmierte Eichkurve im Konzentrationsbereich von 2 µg bis 25 µg enthielt, durchgeführt. Je nach Herstellung der Membran- bzw. der cytosolischen Fraktion wurde eine 1:10 bis 1:50 Verdünnung in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> hergestellt und gut durchmischt. Von der Verdünnung wurde soviel in den Reaktionsansatz eingesetzt, dass der erhaltene Messwert zwischen 5 µg und 15 µg lag (dies vermindert mögliche Messfehler). Jede Messung wurde zweimal parallel durchgeführt und aus den erhaltenen Werten das arithmetische Mittel gebildet. Ebenso wurde mit einem 10 µg BSA-Standard verfahren. Die erhaltenen Messwerte wurden anschließend um den Faktor der Abweichung des BSA-Standards korrigiert.

#### **V.4.3 Mitochondrienisolierung**

Für die Isolierung der Mitochondrien (Diekert *et al.*, 2001) wurden Zellen einer ÜN-Kultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5-1 in 400 ml Medium in einem 1 l Erlenmeyerkolben angezogen. Die Zellen wurden geerntet, mit 40 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gewaschen und das Nassgewicht (zwischen 0,2-0,5 g) bestimmt. Anschließend wurden 1,5 mg Zymolyase 100 T/g Nassgewicht der Zellen in 0,5 ml SP-Puffer/1,5 mg Zymolyase gelöst und für 30 min bei 30 °C inkubiert. Während dessen wurden die Zellen in 1 ml TD-

Puffer resuspendiert (löst Disulfidbrücken von Zellwandproteinen) und für 5 min bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden für 5 min bei 2.500 g pelletiert, in 8 ml SP-Puffer resuspendiert, für die Spheroblastierung mit der gelösten Zymolyase versetzt und die Zellwand für 15-30 min bei 30 °C verdaut. Um die Spheroblastierung zu untersuchen, wurden 3 µl der Zellsuspension auf einen Objektträger übertragen und mit einem Deckglas mikroskopiert. Anschließend wurde von der Seite  $H_2O_{dest}$  zugeführt, was bei erfolgreicher Spheroblastierung zum Platzen der Zellen führte. Nach erfolgreichem Zellwandverdau wurden die Zellen für 5 min bei 500 g und 4 °C abzentrifugiert, zweimal mit eiskaltem SP-Puffer gewaschen und in 2-fach SHP-Puffer resuspendiert. Danach wurde die Suspension mit einem Volumen eiskaltem  $H_2O_{dest}$ , das 1 mM PMSF und 1 mM Benzamidin enthielt, verdünnt, durch 15-20 Stöße mit einem Potter homogenisiert und die Mitochondrien für 30 min bei 120.000 g in der Ultrazentrifuge pelletiert.

**TD-Puffer:** 100 mM Tris- $SO_4$  (pH 9,4), 10 mM DTT (frisch zugeben)

**SP-Puffer:** 1,2 M Sorbit, 20 mM Kaliumphosphat (pH 7,4)

**2x SHP-Puffer:** 2,4 M Sorbit, 40 mM Hepes-KOH (pH 7,4), 1 mM PMSF (frisch zugeben), 1 mM Benzamidin (frisch zugeben)

#### **V.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-PAGE wurde in dem Gelelektrophoresesystem Mini-Protean III von BioRad durchgeführt. Für die Analyse der Proteine wurden 8-12,5%ige Trenngele verwendet. Vor dem Auftrag auf das Gel wurden die Proteine denaturiert, wobei cytosolische Proteine für 5 min bei 95 °C, Membranproteine für 15 min bei 45 °C erhitzt wurden.

Die Elektrophorese erfolgte bei 210 V konstant bis zum Austreten der Bromphenolblaubande. Als Laufpuffer diente SDS-Puffer und als Standart wurde der pEqGOLD Protein Marker I (14,4 kDa - 160,0 kDa) verwendet.

**SDS-Laufpuffer:** 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0,1% SDS

#### **V.4.5 Western-Blot**

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurde die Übertragung der Proteine auf die Nitrozellulosemembran BA-S85 mittels der Mini-Protean III Zelle von BioRad („wetblot“) durchgeführt.

Vor dem Zusammenbau des „Blots“ in der „wetblot“-Halterung wurden Schwämme, Whatman-Papier (6,5 x 9 cm) und Nitrozellulose (6 x 8,5 cm) 15 min in Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wurden in einem Schälchen mit Transferpuffer auf die Anodenseite einer „wetblot“-Halterung ein Schwamm, 3x Whatman-Papier, Nitrozellulose, Gel, 3x Whatman-Papier und ein Schwamm gelegt. Nach dem Entfernen von Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten wurde die „wetblot“-Halterung in die Blotkammer eingesetzt und mit Transferpuffer gefüllt. Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran wurde für 30 min bei 360 mA oder 90 min bei 150 mA (vom Protein abhängig)

durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulosemembran mit Ponceau S-Lösung gefärbt, der Standart mit Bleistift angezeichnet und die Membran mit  $H_2O_{dest}$  entfärbt. Um unspezifische Bindungen abzusättigen wurde die Membran für eine 1 h oder über Nacht in „Blocking-Puffer“ mit 0,2% Tween 20 und 5% Magermilch blockiert, zweimal mit „Blocking-Puffer“ gewaschen und wie in Tabelle V.2 angegeben mit den Antikörpern dekoriert.

Protein	1. Antikörper	2. Antikörper
Aif1-FLAG	Monoclonal Anti-FLAG <sup>®</sup> antibody (1:12000)	Anti Mouse IgG, Peroxidase conjugate 1:5000
Cytochrom <i>c</i>	Anti Yeast Cytochrom <i>c</i> Antiserum, 1:1000 (R. Lill)	Anti Rabbit IgG, Peroxidase conjugate 1:5000
Kex1-ZZ	Anti Mouse IgG 1:5000	-
Qri7-ZZ	Anti Mouse IgG 1:5000	-
Yet2-ZZ	Anti Mouse IgG 1:5000	-

**Tabelle V.2: Verdünnungen der verwendeten Antikörper.**

Die Antikörper wurden in 5 ml „Blocking-Puffer“ mit 1% Magermilch verdünnt und für 1 h mit der Nitrozellulose inkubiert. Nach jeder Antikörperdekoration wurde die Membran einmal mit 30 ml „Blocking-Puffer“ mit 0,2% Tween 20 und 1% Magermilch und zweimal mit je 30 ml „Blocking-Puffer“ für je 15 min gewaschen. Nach dem Entfernen der ungebundenen Antikörper wurde die Membran mit insgesamt 500 µl des „SuperSignal West Pico Chemiluminescent“ Substrats für 5 min überschichtet. Danach wurde ein Röntgenfilm auf die Nitrozellulose gelegt und nach entsprechender Belichtung (abhängig vom Protein) entwickelt.

**Transferpuffer:** 20 mM Tris, 150 mM Glycin, 20% Methanol (v/v), 0,02% SDS

**„Blocking-Puffer“:** 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl

#### **V.4.6 Radioaktive Markierung der Carboxypeptidase Y mit [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein**

Aus einer logarithmischen Übernachtskultur ( $OD_{600}$  zwischen 1-3), angezogen in Vollmedium bzw. Minimalmedium mit den entsprechenden Aminosäuren, wurden 15 OD Zellen geerntet, 5 min bei 1.100 g in der Hettich Tischzentrifuge abzentrifugiert und einmal mit Minimalmedium CM-Glukose mit den entsprechenden Aminosäuren gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 5 ml YNB-Glukose mit den entsprechenden Aminosäuren aufgenommen und für 30 min bei 30 °C in einem 25 ml Kolben inkubiert. Die Markierung wurde durch Zugabe von 75 µCi [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein gestartet und die Kultur für weitere 30 min bei 30 °C inkubiert.

Anschließend wurde die Suspension in Falcon-Röhrchen überführt, abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Nach Abstoppen der Markierung durch Aufnahme des Pellets in 2 ml 10 mM Na-Azid wurden die Zellen abzentrifugiert. Um die Zellen aufzuschließen, wurde das Zellpellet in 300 µl Aufschlusspuffer aufgenommen, in ein Glasfiolax-Röhrchen mit 1,2 g Glasperlen (Ø 0,45-0,55 mm) überführt und 10 min bei maximaler Drehzahl im Reagenzglasschüttler Vibrax-VXR bei 4 °C

aufgeschlossen. Der Überstand wurde mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgehoben, die Glasperlen mit 200 µl Aufschlusspuffer gewaschen und die beiden Überstände vereinigt. Die Suspension wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und 30 min bei 48.000 g im SS34 Rotor abzentrifugiert, um ganze Zellen und Zellfragmente zu entfernen. Der Überstand wurde abgenommen und mit 1/10 Volumen von 10% SDS für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde 1 ml TNET-Puffer (verdünnt das SDS) und 3 µl polyklonaler CPY-Antikörper zugeführt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Um unspezifische Aggregate zu entfernen wurde tags darauf noch einmal für 30 min bei 48.000 g im SS34 Rotor zentrifugiert. Danach wurde je Ansatz 5 mg Protein-A-Sepharose abgewogen, 30 min auf Eis in 1 ml TNET vorgequollen und 2x mit 1 ml TNET-Puffer gewaschen. Dabei wurde die Protein-A-Sepharose 2-3 min bei 16.000 g in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Anschließend wurde der radioaktive Überstand zur Protein-A-Sepharose gegeben, gevortext, mit Parafilm verschlossen und zur Präzipitation der Antigen-Antikörper-Komplexe 90-120 min bei 4 °C gerollert. Danach wurde die Protein-A-Sepharose mit dem Antigen-Antikörper-Komplex 3 min abzentrifugiert, 4x mit 1 ml TNET und 1x mit Tris-Saline gewaschen. Zu dem Ansatz wurden 30 µl SDS-Probenpuffer gegeben, mit der Pipettenspitze vermischt, 5 min bei 95 °C aufgeköcht (dadurch wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe von der Protein-A-Sepharose gelöst), abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zum verbleibenden Pellet wurden erneut 30 µl SDS-Probenpuffer gegeben, vermischt, aufgeköcht, abzentrifugiert, mit dem vorher abgehobenen Überstand vereinigt und auf einem 8%igen SDS-Gel analysiert (35 mA für etwa 3 h) . Nach Comassiefärbung über Nacht und Entfärbung für 90-120 min wurde das Gel für 30 min in „Amplify“-Lösung geschwenkt, 3 h bei 60 °C getrocknet und je nach Signalstärke 2-3 Tage bei -80 °C auf einen BioMax<sup>TM</sup> Röntgenfilm der Firma Kodak exponiert.

**Aufschlusspuffer:** 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EtSH, 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidin

**TNET:** 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 3 mM EDTA, 50 mM NaCl, 1% (v/v) Triton-X-100

**Tris-Saline:** 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl

#### **V.4.7 Caspaseaktivitätstest**

Um die Aktivität von Caspasen zu untersuchen (Lauber *et al.*, 2001) wurden von einer Übernachtskultur (OD<sub>600</sub> zwischen 0,5-1) 15 OD Zellen geerntet, 5 min bei 300 g zentrifugiert und mit 5 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) gewaschen. Die Zellen wurden in 300 µl Puffer 1 aufgenommen, in ein Fiolaxglas mit 1,2 g Glasperlen (Ø 0,45-0,55 mm) überführt und 10 min bei 4 °C aufgeschlossen. Danach wurde der Überstand mit einer ausgezogenen Pasteurpipette in ein Eppendorfgefäß abgehoben, die Glasperlen erneut mit 200 µl Puffer 1 gewaschen und die beiden Überstände vereinigt. Das Lysat wurde 30 min bei 48.000 g abzentrifugiert und der Überstand zur Analyse der Caspaseaktivität verwendet.

**Puffer 1 (Lysepuffer):** 0,5% Nonidet, 20 mM Hepes (pH 7,3), 84 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM EDTA, 0,2 mM EGTA, 1 mM DTT, 5 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin, 1 mM PMSF

**Puffer 2 (2-fach):** 50 mM Hepes (pH 7,3), 100 mM NaCl, 10% Saccharose, 0,1% CHAPS, 10 mM DTT

**Reaktionsansatz:** 500 µl Puffer 2 (2-fach), 50 µg cytosolischer Extrakt, 40 µM der unterschiedlichen Substrate, ad 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

Der Reaktionsansatz wurde für 6 h bei 37 °C inkubiert, anschließend im Jobin Yvon-Spex Fluoromax-2 Spektrofluorimeter vermessen und die Daten mit DataMax Software analysiert. Die Anregung von 7-Amino-4-Trifluoromethylcoumarin (AFC) erfolgte bei 400 nm, die Emission wurde bei 489 nm abgegriffen. 7-Amino-4-Methylcoumarin (AMC) wurde bei 370 nm angeregt, die Emission bei 440 nm detektiert.

#### V.4.8 Kex1p Aktivitätstest

Solubilisierung: Membranen aus V.4.1.3 wurden auf Eis aufgetaut und in Membranaufnahmepuffer verdünnt. Unter ständigem Kühlen auf Eis wurden tropfenweise 4 M KCl und 10% Octylglycosid bis zu einer Endkonzentration von 0,5 M KCl und 1% Octylglycosid innerhalb von 20 min zugegeben, wobei der Ansatz alle 2 min gevortext wurde (die Proteinkonzentration im Solubilisierungsansatz betrug 6-8 µg/µl). Der Solubilisierungsansatz wurde für 40 min bei 150.000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand für die Immunpräzipitation verwendet.

Präzipitation: 100 µl IgG Sepharose 6 Fast Flow wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nachdem sich die Sepharosekügelchen abgesetzt hatten, wurde der Überstand abgenommen und die Sepharosekügelchen 3x mit TN gewaschen (Zentrifugation für 3 min bei 300 g). Zu den Sepharosekügelchen wurden 200 µl des Solubilisats gegeben und der Ansatz wurde für 1 h bei 4°C gerollert. Nach Zentrifugieren für 3 min bei 300 g und 4 °C wurden die Sepharosekügelchen 3x mit 400 µl 25 mM Bis-Tris-HCl (pH 6,3) gewaschen.

In vitro Test: Für die Aktivitätstests wurden Membranen im großen Maßstab isoliert (siehe V.4.1.3), das am C-Terminus mit einem Protein A Epitop fusionierte Kex1p aus den Membranen solubilisiert und mittels IgG Sepharose 6 Fast Flow immunpräzipitiert.

**TN-Puffer:** 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl

##### V.4.8.1 Messung des FA-Ala-Arg-OH Umsatzes in einer spektrophotometrischen Analyse

Die Untersuchung der Kex1p-ZZ Aktivität wurde nach einem von Plummer und Kimmel modifizierten Protokoll durchgeführt (Plummer und Kimmel, 1980). Für die Analyse der Kex1p-ZZ *in vitro* Aktivität wurden 0,4 mM Kex1p-Substrat FA-Ala-Arg-OH (20 mM Stammlösung in Methanol) und 930 µl Bis-Tris-HCl (pH 6,3) zu 50 µl IgG Sepharosekügelchen gegeben, an die *KEX1-ZZ* gebunden war (siehe V.4.3). Der Ansatz wurde kurz gemischt, die Sepharosekügelchen für 15 s bei

16.000 g abzentrifugiert, 500 µl des Überstands in eine Küvette überführt und die Emission bei 340 nm im Spektrophotometer Novaspec II (Amersham) detektiert (Nullwert). Anschließend wurde der Überstand zurück zu den Sepharosekügelchen gegeben, für 15 min bei RT gerollert und wiederum die Emission gemessen. Um die Abnahme der Emission, die durch Abspaltung des Argininrestes vom C-terminalen Ende des Substrates FA-Ala-Arg-OH zustande kam, zu errechnen, wurde der nach 15 min erhaltene Wert vom zuvor bestimmten Nullwert abgezogen.

#### **V.4.8.2 Messung des Ac-VEID-AMC Umsatzes in einer fluorimetrischen Analyse**

Um die Enzymaktivität bezüglich des Caspasesubstrats Ac-VEID-AMC zu detektieren wurden 930 µl Bis-Tris-HCl (pH 6,3) und 40 µM Ac-VEID-AMC (2 mM Stammlösung in DMSO) zu 50 µl Sepharosekügelchen gegeben, an die Kex1p-ZZ gebunden war. Nach Vortexen des Ansatzes und Abzentrifugieren der Sepharosekügelchen wurde die Emission des Überstands bei 440 nm nach Anregung bei 370 nm im Yvon-Spec Fluoromax-2 Spektrofluorimeter (DataMax Software) gemessen (dies entspricht dem Nullwert). Der Überstand wurde zurück zu den Sepharosekügelchen gegeben und für 2 h bei RT gerollert. Danach wurden die Sepharosekügelchen wieder abzentrifugiert und der Reaktionsansatz wie beschrieben vermessen. Um den bereinigten Wert zu erhalten wurde der nach 2 h Inkubation erhaltene Messwert vom Nullwert abgezogen.

### **V.4.9 Transkriptomanalyse**

#### **V.4.9.1 Theoretische Grundlagen und Auswertung der Transkriptomanalyse**

Die isolierte und gereinigte RNA wurde durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA dient als Vorlage für die *in vitro* Transkription, wo anstelle von UTP synthetisches mit Biotin gekoppeltes UTP als Nukleobase angeboten wurde. Die daraus resultierende Biotin-gefärbte cRNA wurde chemisch in 50-200 bp große Bruchstücke fragmentiert und anschließend zur Hybridisierung auf einen GeneChip® Yeast Genome 2.0 Array überführt. Die auf dem Gene Chip lokalisierten 25 bp langen Oligonukleotide, die ca. 5.800 *S. cerevisiae* Genen representieren, dienen für die Biotin gefärbte cRNA als Sonde. Die Hybridisierung erfolgte für 16 h im Hybridisierungssofen. Danach wurde nicht gebundene cRNA durch einige Waschschrte entfernt und die Biotin gefärbten Hybridisate mit Phycoerythrin konjugierten Streptavidin, das an Biotin bindet, gefärbt. Zur Amplifizierung des Fluoreszenzsignals wurde ein mit einem Fluorophor konjugierter Anti-Phycoerythrin Antikörper zugegeben. Anschließend wurde der GeneChip mit dem GeneChip® Scanner 3000 eingescannt und die Fluoreszenzintensität mittels der GeneChip® Operating Software v1.1.1 detektiert.

Für die Auswertung der Transkriptomanalyse wurden nur diejenigen Werte verwendet, deren absolute Werte, die sich aus der detektierten Fluoreszenzintensität ableiten lassen, über 20 lagen. Werte unter 20 weisen eine gewisse Messungenauigkeit auf, die sich beim Vergleich der Transkriptome zueinander um ein Vielfaches verstärken kann. Da die Transkriptomanalyse nur einmal durchgeführt worden war,

wurden in die Auswertung der Transkriptomanalyse, falls nicht anders angegeben, nur diejenigen Gene mit einbezogen, die verglichen mit der Kontrolle mindestens um das doppelte hochreguliert worden waren. Es wurden jeweils die Transkriptome von *wbp1-1* inkubiert für 4 h bei 37 °C mit Wildtyp inkubiert für 4 h bei 37 °C (Spalten 1 und 2) und *wbp1-1* inkubiert für 4 h bei 37 °C mit *wbp1-1* inkubiert bei 25 °C (Spalten 3 und 4) miteinander verglichen. In beiden Fällen führte der „Temperaturshift“ der Mutante im Vergleich zu den Kontrollen zur Induktion des N-Glykosylierungsdefekts und der daraus resultierenden Initiierung des programmierten Zelltods. Für die Veränderung der Transkriptome zueinander wurden folgende Abkürzungen verwendet: Increase (I), Decrease (D), not countabel (NC).

#### **V.4.9.2 Anzucht der Zellen**

Für die Transkriptomanalyse wurden *wbp1-1* und der korrespondierende Wildtypstamm SS328 über Nacht aus einer frischen Vorkultur in 70 ml YPD in einem 250 ml Erlenmeyerkolben im Wasserbadschüttler bei 25 °C und 270 rpm auf eine OD von 0,2 angeimpft. Hier wurden die Kulturen geteilt und die 250 ml Kolben für 4 h weiter bei 25 °C und bei der restriktiven Temperatur von 37 °C inkubiert.

#### **V.4.9.3 RNA-Isolierung und Weiterverarbeitung im Kompetenzzentrum**

Von einer logarithmischen Kultur (OD = 1) wurden 20 OD Zellen für 2 min bei 3.000 g und 4 °C abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgehoben, die Zellen in 1 ml 0,1% Diethylpyrocarbonat-H<sub>2</sub>O (DEPC-H<sub>2</sub>O wurde verwendet, um im Wasser vorhandene RNAsen zu eliminieren) resuspendiert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Sicherheitsverschluss überführt. Die Zellen wurden für 30 s bei 16.000 g und 4 °C zentrifugiert und in 400 µl AE-Puffer durch Vortexen resuspendiert. Nach Zugabe von 40 µl vorgewärmten (65 °C) 10%igen SDS und 440 µl vorgewärmten (65 °C) AE-äquilibrierten Phenol wurde das Reaktionsgefäß für 4 min bei 65 °C und 1.300 rpm in einem Thermoschüttler inkubiert. Das Reaktionsgefäß wurde anschließend solange im Trockeneis/Ethanolbad geschwenkt, bis das Phenol kristallisierte. Die Proben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, 2 min bei 16.000 g zentrifugiert und die obere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 400 µl Phenol-Chloroform (1:1) wurde 1 min gevortext, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, für 2 min bei 16.000 g und 4 °C zentrifugiert und die obere, wässrige Phase wieder in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,3) zugegeben und die RNA mit 2,5 fachen Volumen Ethanol für 1 h bei -20°C gefällt. Die gefällte RNA wurde für 5 min bei 16.000 g und 4 °C abzentrifugiert, das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur unter der Sterilbank getrocknet. Das RNA-Pellet wurde bei 60 °C in 50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und bis zur Verwendung für die Transkriptomanalyse bei -80 °C gelagert (Schmitt *et al.*, 1990). Die Konzentrationsbestimmung und die Qualitätskontrolle der RNA, sowie die Durchführung der Transkriptomanalyse mit dem

GeneChip<sup>®</sup> Yeast Genome 2.0 Array von Affymetrix wurden im **Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik** (KFB; Josef-Engert-Straße 9, 93053 Regensburg) durchgeführt. Die erhaltenen Daten wurden im KFB mittels der Affymetrix *GeneChip Operating Software (GCOS) 1.2* ausgewertet.

**AE-Puffer:** 50 mM Na-Acetat (pH = 5,3), 10 mM EDTA, mit DEPC-H<sub>2</sub>O auffüllen

**AE-äquilibriertes Phenol:** Phenol mit dem gleichen Volumen an AE-Puffer überschichten, absetzen lassen und obere, wässrige Phase verwerfen.



# Abbildungsverzeichnis

I.1:	Die intrinsische und extrinsische Signalkaskade der Apoptose im Säuger .....	14
I.2:	Grundlegende Bestandteile der apoptotischen Signalkaskade in <i>S. cerevisiae</i> .....	18
I.3:	Darstellung der Makro-Autophagozytose in <i>S. cerevisiae</i> .....	21
I.4:	Illustration der im ER lokalisierten Schritte der N-Glykosylierung und des Transfers des core-Oligosaccharids auf das naszierende Protein durch den Oligosaccharyltransferase-komplex in <i>S. cerevisiae</i> .....	25
I.5:	Analyse apoptotischer Phänotypen induziert durch eine defekte N-Glykosylierung.....	26
II.1:	Nachweis von Caspaseaktivität in <i>wbp1-1</i> durch Färbung der Zellen mit FITC-VAD-FMK..	31
II.2:	Analyse von Caspase- bzw. Aspartaseaktivität in <i>wbp1-1</i> durch Inkubation der Zellen mit D <sub>2</sub> R.....	33
II.3:	Caspaseaktivität in zellfreien Extrakten.....	35
II.4:	Defekte in der N-Glykosylierung führen zu ROS-Akkumulation.....	36
II.5:	Induktion des N-Glykosylierungsdefekts induziert Mitochondrienfragmentierung.....	39
II.6:	Reduziertes Glutathion vermindert ROS-Akkumulation und Caspaseaktivität und erhöht die Überlebensrate der <i>wbp1-1</i> Mutante.....	44
II.7:	Inkubation der <i>wbp1-1</i> Mutante mit NAC verringert die Caspaseaktivität und steigert die Überlebensrate.....	45
II.8:	Caspaseaktivität, ROS-Akkumulation und der Verlust der Plasmamembranintegrität sind von der Proteinneusynthese abhängig.....	46
II.9:	Heterologe Expression des humanen <i>Bcl-2</i> reduziert Caspaseaktivität, verbessert die Überlebensrate und unterdrückt den Wachstumsphänotyp von <i>wbp1-1</i> .....	47
II.10:	Osmotische Stabilisierung der <i>wbp1-1</i> Mutante durch Sorbit ist stark abhängig von der Wachstumsphase der Kultur zum Zeitpunkt des „Temperaturshifts“ .....	51
II.11:	Hemmung der Protein N-Glykosylierung durch Tunicamycin im Wildtyp SS328.....	53
II.12:	Reduktion von Caspaseaktivität, ROS-Akkumulation und PI-positiven Zellen durch Zugabe des Proteinbiosynthesehemmstoffs Cycloheximid, des Antioxidationsmittels NAC und des Breitspektrum-Caspasehemmstoffs zVAD-FMK.....	54
II.13:	Analyse der Mitochondrienmorphologie im Wildtyp BY4741 nach Behandlung der Zellen mit 10µg/ml Tunicamycin bei einer Inkubationstemperatur von 37°C.....	55
II.14:	Überexpression von <i>OST2</i> führt zu keiner Veränderung des N-Glykosylierungsdefekts, der Caspaseaktivität und der ROS-Produktion in <i>wbp1-1</i> .....	59
II.15:	Disruption von <i>AIF1</i> in <i>wbp1-1</i> verursacht keine Veränderung der Überlebensrate, der ROS-Produktion und der Caspaseaktivität .....	62
II.16:	Überexpression von <i>AIF1</i> in <i>wbp1-1</i> führt zu keiner Stimulation des programmierten Zelltods.....	63
II.17:	Disruption von <i>NDI1</i> in <i>wbp1-1</i> hat keine Auswirkungen auf Caspaseaktivität und ROS-Akkumulation .....	63
II.18:	Disruption von <i>NMA111</i> in <i>wbp1-1</i> verursacht keine Veränderung der Absterberate, ROS-Akkumulation und Caspaseaktivität .....	64

II.19: Auswirkungen der Disruption und Expression von <i>YET2</i> in <i>wbp1-1</i> auf Caspaseaktivität und Überlebensrate.....	66
II.20: Analyse der Lokalisation von Qri7p.....	70
II.21: Disruption von <i>QRI7</i> in <i>wbp1-1</i> vermindert ROS-Akkumulation, PI-Färbung und Caspaseaktivität und verbessert die Überlebensrate.....	71
II.22: Überprüfung von Überexpression, Lokalisation und Funktionalität von Qri7p.....	72
II.23: Überexpression von <i>QRI7-ZZ</i> in <i>wbp1-1</i> bei restriktiver Temperatur führt zu einer erhöhten Absterberate und zu einem Anstieg der Caspaseaktivität und ROS-Akkumulation.....	73
II.24: Disruption von <i>KEX1</i> in <i>wbp1-1</i> unterdrückt den Wachstumsphänotyp von <i>wbp1-1</i> und verbessert dessen Wachstumsverhalten bei 37°C.....	75
II.25: Radioaktive Markierung der Carboxypeptidase Y mit [ <sup>35</sup> S]-Methionin/Cystein in <i>wbp1-1</i> und <i>Δkex1</i> .....	75
II.26: Deletion von <i>KEX1</i> und <i>KEX2</i> vermindert im Vergleich zu <i>YCA1</i> die Caspaseaktivität nach Färbung der Zellen mit FITC-VAD-FMK.....	76
II.27: Disruption von <i>KEX1</i> und <i>KEX2</i> reduziert die Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies im Gegensatz zu <i>YCA1</i> .....	77
II.28: Disruption der Proteasen <i>KEX1</i> und <i>KEX2</i> in <i>wbp1-1</i> verhilft den Zellen zu einer besseren Überlebensrate, wobei Deletion von <i>YCA1</i> keinen Effekt zeigt.....	78
II.29: Disruption der Protease <i>KEX1</i> minimiert das Schrumpfen der Zellen in <i>wbp1-1</i> .....	79
II.30: Verlauf der mitochondriellen Fragmentierung in <i>wbp1-1</i> und <i>wbp1-1Δkex1</i> .....	80
II.31: Auswirkung der <i>KEX1</i> -Deletion in Wildtypstämmen auf apoptotische Merkmale.....	81
II.32: Chronologisches Altern in SS328 und SS328 <i>Δkex1</i> .....	82
II.33: Disruption von <i>KEX1</i> im Wildtyp SS328 vermindert die ROS-Produktion und verbessert die Überlebensrate nach Induktion der Apoptose durch Essigsäurestress.....	84
II.34: Lokalisations- und Funktionalitätsanalyse von Kex1p in <i>wbp1-1</i> .....	86
II.35: Überexpression von <i>KEX1</i> führt zu keiner Veränderung der analysierten apoptotischen Merkmale.....	87
II.36: Wachstumsverhalten von <i>wbp1-1</i> und der Autophagozytosedisruptanten.....	93
II.37: Durchflußzytometrische Untersuchung von Caspaseaktivität, ROS-Produktion und PI-Färbung von <i>wbp1-1</i> und den Autophagozytosedisruptanten.....	94
II.38: Analyse der Mitochondrienmorphologie in <i>wbp1-1</i> , <i>Δatg5</i> und <i>Δatg8</i> nach Inkubation der Kulturen für 6h bei 37°C.....	95
II.39: Analyse apoptotischer Merkmale in BY4741 und den Autophagozytosedisruptanten nach Behandlung der Kulturen mit 10μg/ml Tunicamycin.....	96
II.40: Auswertung von Caspaseaktivität, ROS-Produktion und Überlebensrate in <i>wbp1-1</i> nach Disruption von <i>UTH1</i> .....	98
II.41: Disruption von <i>UTH1</i> in <i>wbp1-1</i> führt zu keiner Veränderung der Mitochondrienmorphologie nach Inkubation der Kulturen bei restriktiver Temperatur.....	99
II.42: Analyse apoptotischer Marker im Wildtyp BY4741 und <i>Δuth1</i> nach Inkubation der Kulturen mit 10μg/ml Tunicamycin.....	100
II.43: Durchflußzytometrische Analyse der Caspaseaktivität nach Inkubation der Stämme für 4 h in YPD bei unterschiedlichen Temperaturen.....	105
II.44: Analyse von ROS-Akkumulation nach Inkubation der Stämme für 4 h in YPD bei unterschiedlichen Temperaturen mittels Durchflußzytometrie.....	105
II.45: Auswirkung der Disruption von <i>IRE1</i> in <i>wbp1-1</i> auf apoptotische Phänotypen und Überlebensrate.....	106
II.46: Analyse von Caspaseaktivität, ROS-Akkumulation und PI-Färbung in BY4741, <i>Δire</i> und <i>Δhac</i> nach Inkubation der Kulturen für unterschiedliche Zeiten bei 37°C mit 10μg/ml Tunicamycin mittels Durchflußzytometrie.....	107
III.1: Mögliche Szenarien der Induktion des programmierten Zelltods durch ER-Stress in <i>S. cerevisiae</i> .....	113
V.1: Schematische Darstellung des optischen Systems des FACS MoFlo.....	124
V.2: Prinzip des Durchflußzytometers MoFlo der Firma Cytomation GmbH.....	125

# Tabellenverzeichnis

II.1: Zusammenfassung der hochregulierten Gene, die an der Beseitigung von ROS beteiligt sind.....	37
II.2: Zusammenfassung der hochregulierten Gene, die für die Erhaltung der Mitochondrienmorphologie wichtig sind.....	40
II.3: Zusammenfassung der hochregulierten Gene, die in DNA-Reparatur und Erhaltung der Telomere involviert sind.....	42
II.4: Zusammenfassung der Gene, die aufgrund von Zellwandstress hochreguliert wurden.....	50
II.5: Auflistung der Gene, die im „Multi-copy Suppressor Screen“ mehrfach identifiziert wurden.....	58
II.6: Auswertung der Transkriptomanalyse für die BAP31 Homologen <i>YET1</i> , <i>YET2</i> und <i>YET3</i> ....	65
II.7: Analyse der Caspaseaktivität in BY4741 (Wildtyp) und in Protease defizienten Stämmen aus der Euroscarf Deletionsgenbank.....	69
II.8: Auflistung von Autophagozytosegenen, die während des programmierten Zelltods ausgelöst durch defekte N-Glykosylierung hochreguliert wurden (Teil 1).....	90
II.8: Auflistung von Autophagozytosegenen, die während des programmierten Zelltods ausgelöst durch defekte N-Glykosylierung hochreguliert wurden (Teil 2).....	91
II.9: Einteilung der hochregulierten Gene in verschiedene Funktionsbereiche der autophagozytotischen Signalkaskade.....	92
II.10: Auflistung der Gene des Sekretorischen Signalwegs, die durch Induktion des UPR hochreguliert wurden.....	102
VI.1: Verwendete Kits.....	116
VI.2: Verwendete Antikörper.....	116
VI.3: Verwendete <i>E. coli</i> Stämme.....	116
VI.4: Verwendete <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stämme.....	117
VI.5: Verwendete Plasmide.....	117
VI.6: Verwendete Oligonukleotide.....	118
V.1: Stamm- und Endkonzentrationen der Additiva.....	127
V.2: Verdünnungen der verwendeten Antikörper.....	137

## VII. Referenzen

- Abeliovich, H., and Klionsky, D.J. (2001) Autophagy in yeast: mechanistic insights and physiological function. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**: 463-479, table of contents.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., and Yuan, J. (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* **87**: 171.
- Angus-Hill, M.L., Schlichter, A., Roberts, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Cairns, B.R. (2001) A Rsc3/Rsc30 zinc cluster dimer reveals novel roles for the chromatin remodeler RSC in gene expression and cell cycle control. *Mol Cell* **7**: 741-751.
- Balzan, R., Sapienza, K., Galea, D.R., Vassallo, N., Frey, H., and Bannister, W.H. (2004) Aspirin commits yeast cells to apoptosis depending on carbon source. *Microbiology* **150**: 109-115.
- Bandara, P.D., Flattery-O'Brien, J.A., Grant, C.M., and Dawes, I.W. (1998) Involvement of the *Saccharomyces cerevisiae* UTH1 gene in the oxidative-stress response. *Curr Genet* **34**: 259-268.
- Bettiga, M., Calzari, L., Orlandi, I., Alberghina, L., and Vai, M. (2004) Involvement of the yeast metacaspase Yca1 in ubp10Delta-programmed cell death. *FEMS Yeast Res* **5**: 141-147.
- Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V., and Wallach, D. (1996) Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* **85**: 803-815.
- Bozhkov, P.V., Filonova, L.H., Suarez, M.F., Helmersson, A., Smertenko, A.P., Zhivotovsky, B., and von Arnold, S. (2004) VEIDase is a principal caspase-like activity involved in plant programmed cell death and essential for embryonic pattern formation. *Cell Death Differ* **11**: 175-182.
- Braun, R.J., Zischka, H., Madeo, F., Eisenberg, T., Wissing, S., Buttner, S., Engelhardt, S.M., Buringer, D., and Ueffing, M. (2006) Crucial mitochondrial impairment upon CDC48 mutation in apoptotic yeast. *J Biol Chem* **281**: 25757-25767.
- Breckenridge, D.G., Germain, M., Mathai, J.P., Nguyen, M., and Shore, G.C. (2003a) Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* **22**: 8608-8618.
- Breckenridge, D.G., Stojanovic, M., Marcellus, R.C., and Shore, G.C. (2003b) Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *J Cell Biol* **160**: 1115-1127.
- Brodsky, J.L., Goeckeler, J., and Schekman, R. (1995) BiP and Sec63p are required for both co- and posttranslational protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 9643-9646.

- Bulik, D.A., Olczak, M., Lucero, H.A., Osmond, B.C., Robbins, P.W., and Specht, C.A. (2003) Chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* in response to supplementation of growth medium with glucosamine and cell wall stress. *Eukaryot Cell* **2**: 886-900.
- Bussey, H. (1988) Proteases and the processing of precursors to secreted proteins in yeast. *Yeast* **4**: 17-26.
- Buttner, S., Eisenberg, T., Herker, E., Carmona-Gutierrez, D., Kroemer, G., and Madeo, F. (2006) Why yeast cells can undergo apoptosis: death in times of peace, love, and war. *J Cell Biol* **175**: 521-525.
- Cheng, E.H., Kirsch, D.G., Clem, R.J., Ravi, R., Kastan, M.B., Bedi, A., Ueno, K., and Hardwick, J.M. (1997) Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* **278**: 1966-1968.
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V.M. (1995) FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**: 505-512.
- Clark, S.L., Jr. (1957) Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studies with the electron microscope. *J Biophys Biochem Cytol* **3**: 349-362.
- Clem, R.J., Cheng, E.H., Karp, C.L., Kirsch, D.G., Ueno, K., Takahashi, A., Kastan, M.B., Griffin, D.E., Earnshaw, W.C., Veluona, M.A., and Hardwick, J.M. (1998) Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 554-559.
- Clow, A., Greenhalf, W., and Chaudhuri, B. (1998) Under respiratory growth conditions, Bcl-x(L) and Bcl-2 are unable to overcome yeast cell death triggered by a mutant Bax protein lacking the membrane anchor. *Eur J Biochem* **258**: 19-28.
- Cooper, A., and Bussey, H. (1989) Characterization of the yeast KEX1 gene product: a carboxypeptidase involved in processing secreted precursor proteins. *Mol Cell Biol* **9**: 2706-2714.
- Cooper, A., and Bussey, H. (1992) Yeast Kex1p is a Golgi-associated membrane protein: deletions in a cytoplasmic targeting domain result in mislocalization to the vacuolar membrane. *J Cell Biol* **119**: 1459-1468.
- Debrabant, A., Lee, N., Bertholet, S., Duncan, R., and Nakhasi, H.L. (2003) Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms. *Int J Parasitol* **33**: 257-267.
- Diekert, K., de Kroon, A.I., Kispal, G., and Lill, R. (2001) Isolation and subfractionation of mitochondria from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Cell Biol* **65**: 37-51.
- Dmochowska, A., Dignard, D., Henning, D., Thomas, D.Y., and Bussey, H. (1987) Yeast KEX1 gene encodes a putative protease with a carboxypeptidase B-like function involved in killer toxin and alpha-factor precursor processing. *Cell* **50**: 573-584.
- Ekert, P.G., Silke, J., and Vaux, D.L. (1999) Caspase inhibitors. *Cell Death Differ* **6**: 1081-1086.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**: 43-50.
- Entian, K.D., Schuster, T., Hegemann, J.H., Becher, D., Feldmann, H., Guldener, U., Gotz, R., Hansen, M., Hollenberg, C.P., Jansen, G., Kramer, W., Klein, S., Kotter, P., Kricke, J., Launhardt, H., Mannhaupt, G., Maierl, A., Meyer, P., Mewes, W., Munder, T., Niedenthal, R.K., Ramezani Rad, M., Rohmer, A., Romer, A., Hinnen, A., and et al. (1999) Functional analysis of 150 deletion mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by a systematic approach. *Mol Gen Genet* **262**: 683-702.
- Erlich, H.A. (1989) Polymerase chain reaction. *J Clin Immunol* **9**: 437-447.
- Esposti, M.D. (2002) The roles of Bid. *Apoptosis* **7**: 433-440.

- Fabrizio, P., Battistella, L., Vardavas, R., Gattazzo, C., Liou, L.L., Diaspro, A., Dossen, J.W., Gralla, E.B., and Longo, V.D. (2004) Superoxide is a mediator of an altruistic aging program in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **166**: 1055-1067.
- Fadeel, B., and Orrenius, S. (2005) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med* **258**: 479-517.
- Fahrenkrog, B., Sauder, U., and Aebi, U. (2004) The *S. cerevisiae* HtrA-like protein Nma111p is a nuclear serine protease that mediates yeast apoptosis. *J Cell Sci* **117**: 115-126.
- Fannjiang, Y., Cheng, W.C., Lee, S.J., Qi, B., Pevsner, J., McCaffery, J.M., Hill, R.B., Basanez, G., and Hardwick, J.M. (2004) Mitochondrial fission proteins regulate programmed cell death in yeast. *Genes Dev* **18**: 2785-2797.
- Fischer, U., Janicke, R.U., and Schulze-Osthoff, K. (2003) Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* **10**: 76-100.
- Frederick, R.L., McCaffery, J.M., Cunningham, K.W., Okamoto, K., and Shaw, J.M. (2004) Yeast Miro GTPase, Gem1p, regulates mitochondrial morphology via a novel pathway. *J Cell Biol* **167**: 87-98.
- Friedrich, S.O. (1997) Der N-Oligosaccharyltransferase-Komplex aus *Saccharomyces cerevisiae*. Untersuchungen zur Interaktion des KAR2 Gens mit OST3 und OST6, sowie Konstruktion einer Ost6-Protein A Chimäre. *Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zellbiologie und Pflanzenphysiologie der naturwissenschaftlichen Fakultät III - Biologie und Vorklinische Medizin der Universität Regensburg*.
- Frohlich, K.U., Fussi, H., and Ruckstuhl, C. (2007) Yeast apoptosis--from genes to pathways. *Semin Cancer Biol* **17**: 112-121.
- Fukuda, H. (1997) Tracheary Element Differentiation. *Plant Cell* **9**: 1147-1156.
- Fulda, S., and Debatin, K.M. (2006) Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* **25**: 4798-4811.
- Fuller, R.S., Sterne, R.E., and Thorner, J. (1988) Enzymes required for yeast prohormone processing. *Annu Rev Physiol* **50**: 345-362.
- Gan, S., and Amasino, R.M. (1997) Making Sense of Senescence (Molecular Genetic Regulation and Manipulation of Leaf Senescence). *Plant Physiol* **113**: 313-319.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., and Ben-Sasson, S.A. (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* **119**: 493-501.
- Giannattasio, S., Guaragnella, N., Corte-Real, M., Passarella, S., and Marra, E. (2005) Acid stress adaptation protects *Saccharomyces cerevisiae* from acetic acid-induced programmed cell death. *Gene* **354**: 93-98.
- Gourlay, C.W., Du, W., and Ayscough, K.R. (2006) Apoptosis in yeast - mechanisms and benefits to a unicellular organism. *Mol Microbiol*.
- Green, D.R., and Kroemer, G. (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* **305**: 626-629.
- Green, G., and MacQuillan, A.M. (1980) Photorepair of ultraviolet-induced petite mutational damage in *Saccharomyces cerevisiae* requires the product of the PHR1 gene. *J Bacteriol* **144**: 826-829.
- Gross, C.L., Innace, J.K., Hovatter, R.C., Meier, H.L., and Smith, W.J. (1993) Biochemical manipulation of intracellular glutathione levels influences cytotoxicity to isolated human lymphocytes by sulfur mustard. *Cell Biol Toxicol* **9**: 259-267.
- Guaragnella, N., Pereira, C., Sousa, M.J., Antonacci, L., Passarella, S., Corte-Real, M., Marra, E., and Giannattasio, S. (2006) YCA1 participates in the acetic acid induced yeast programmed cell death also in a manner unrelated to its caspase-like activity. *FEBS Lett* **580**: 6880-6884.

- Hanada, M., Aime-Sempe, C., Sato, T., and Reed, J.C. (1995) Structure-function analysis of Bcl-2 protein. Identification of conserved domains important for homodimerization with Bcl-2 and heterodimerization with Bax. *J Biol Chem* **270**: 11962-11969.
- Heeren, G., Jarolim, S., Laun, P., Rinnerthaler, M., Stolze, K., Perrone, G.G., Kohlwein, S.D., Nohl, H., Dawes, I.W., and Breitenbach, M. (2004) The role of respiration, reactive oxygen species and oxidative stress in mother cell-specific ageing of yeast strains defective in the RAS signalling pathway. *FEMS Yeast Res* **5**: 157-167.
- Heinisch, J.J., Lorberg, A., Schmitz, H.P., and Jacoby, J.J. (1999) The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **32**: 671-680.
- Herbert, B., Pitts, A.E., Baker, S.I., Hamilton, S.E., Wright, W.E., Shay, J.W., and Corey, D.R. (1999) Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 14276-14281.
- Herker, E., Jungwirth, H., Lehmann, K.A., Maldener, C., Frohlich, K.U., Wissing, S., Buttner, S., Fehr, M., Sigrist, S., and Madeo, F. (2004) Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *J Cell Biol* **164**: 501-507.
- Hill, J.E., Myers, A.M., Koerner, T.J., and Tzagoloff, A. (1986) Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* **2**: 163-167.
- Hiraoka, W., Fuma, K., and Kuwabara, M. (1997) Concentration-dependent modes of cell death in Chinese hamster V79 cells after treatments with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J Radiat Res (Tokyo)* **38**: 95-102.
- Hitomi, J., Katayama, T., Eguchi, Y., Kudo, T., Taniguchi, M., Koyama, Y., Manabe, T., Yamagishi, S., Bando, Y., Imaizumi, K., Tsujimoto, Y., and Tohyama, M. (2004a) Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol* **165**: 347-356.
- Hitomi, J., Katayama, T., Taniguchi, M., Honda, A., Imaizumi, K., and Tohyama, M. (2004b) Apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress depends on activation of caspase-3 via caspase-12. *Neurosci Lett* **357**: 127-130.
- Horvitz, H.R., Sternberg, P.W., Greenwald, I.S., Fixsen, W., and Ellis, H.M. (1983) Mutations that affect neural cell lineages and cell fates during the development of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **48 Pt 2**: 453-463.
- Huang, W.P., Scott, S.V., Kim, J., and Klionsky, D.J. (2000) The itinerary of a vesicle component, Aut7p/Cvt5p, terminates in the yeast vacuole via the autophagy/Cvt pathways. *J Biol Chem* **275**: 5845-5851.
- Hug, H., Los, M., Hirt, W., and Debatin, K.M. (1999) Rhodamine 110-linked amino acids and peptides as substrates to measure caspase activity upon apoptosis induction in intact cells. *Biochemistry* **38**: 13906-13911.
- Huh, G.H., Damsz, B., Matsumoto, T.K., Reddy, M.P., Rus, A.M., Ibeas, J.I., Narasimhan, M.L., Bressan, R.A., and Hasegawa, P.M. (2002) Salt causes ion disequilibrium-induced programmed cell death in yeast and plants. *Plant J* **29**: 649-659.
- Ish-Horowicz, D., and Burke, J.F. (1981) Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res* **9**: 2989-2998.
- Ivanovska, I., and Hardwick, J.M. (2005) Viruses activate a genetically conserved cell death pathway in a unicellular organism. *J Cell Biol* **170**: 391-399.
- Jagasia, R., Grote, P., Westermann, B., and Conradt, B. (2005) DRP-1-mediated mitochondrial fragmentation during EGL-1-induced cell death in *C. elegans*. *Nature* **433**: 754-760.
- Jiang, F., Ryan, M.T., Schlame, M., Zhao, M., Gu, Z., Klingenberg, M., Pfanner, N., and Greenberg, M.L. (2000) Absence of cardiolipin in the *crd1* null mutant results in

- decreased mitochondrial membrane potential and reduced mitochondrial function. *J Biol Chem* **275**: 22387-22394.
- Kametaka, S., Matsuura, A., Wada, Y., and Ohsumi, Y. (1996) Structural and functional analyses of APG5, a gene involved in autophagy in yeast. *Gene* **178**: 139-143.
- Karbowski, M., and Youle, R.J. (2003) Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ* **10**: 870-880.
- Kelberg, E.P., Kovaltsova, S.V., Alekseev, S.Y., Fedorova, I.V., Gracheva, L.M., Evstukhina, T.A., and Korolev, V.G. (2005) HIM1, a new yeast *Saccharomyces cerevisiae* gene playing a role in control of spontaneous and induced mutagenesis. *Mutat Res* **578**: 64-78.
- Kennedy, B.K., Austriaco, N.R., Jr., Zhang, J., and Guarente, L. (1995) Mutation in the silencing gene SIR4 can delay aging in *S. cerevisiae*. *Cell* **80**: 485-496.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**: 239-257.
- Khurana, S.M.P., Pandey, K.P., Sarker, D., and Chanemougasoundharam, A. (2005) Apoptosis in plant disease response: A close encounter of the pathogen kind. *Current Science* **88**: 740-752.
- Kimata, Y., Kimata, Y.I., Shimizu, Y., Abe, H., Farcasanu, I.C., Takeuchi, M., Rose, M.D., and Kohno, K. (2003) Genetic evidence for a role of BiP/Kar2 that regulates Ire1 in response to accumulation of unfolded proteins. *Mol Biol Cell* **14**: 2559-2569.
- Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1999) Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J Cell Biol* **147**: 435-446.
- Kissova, I., Deffieu, M., Manon, S., and Camougrand, N. (2004) Uth1p is involved in the autophagic degradation of mitochondria. *J Biol Chem* **279**: 39068-39074.
- Kissova, I., Plamondon, L.T., Brisson, L., Priault, M., Renouf, V., Schaeffer, J., Camougrand, N., and Manon, S. (2006) Evaluation of the roles of apoptosis, autophagy, and mitophagy in the loss of plating efficiency induced by Bax expression in yeast. *J Biol Chem* **281**: 36187-36197.
- Klionsky, D.J., and Emr, S.D. (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* **290**: 1717-1721.
- Klionsky, D.J., Cregg, J.M., Dunn, W.A., Jr., Emr, S.D., Sakai, Y., Sandoval, I.V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M., and Ohsumi, Y. (2003) A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* **5**: 539-545.
- Knauer, R., and Lehle, L. (1999) The oligosaccharyltransferase complex from *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation of the OST6 gene, its synthetic interaction with OST3, and analysis of the native complex. *J Biol Chem* **274**: 17249-17256.
- Kohda, T.A., Tanaka, K., Konomi, M., Sato, M., Osumi, M., and Yamamoto, M. (2007) Fission yeast autophagy induced by nitrogen starvation generates a nitrogen source that drives adaptation processes. *Genes Cells* **12**: 155-170.
- Kroemer, G., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Peter, M.E., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., Blagosklonny, M.V., Malorni, W., Knight, R.A., Piacentini, M., Nagata, S., and Melino, G. (2005) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**: 1463-1467.
- Lambert, G., Becker, B., Schreiber, R., Boucherot, A., Reth, M., and Kunzelmann, K. (2001) Control of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression by BAP31. *J Biol Chem* **276**: 20340-20345.
- Lang, T., Schaeffeler, E., Bernreuther, D., Bredschneider, M., Wolf, D.H., and Thumm, M. (1998) Aut2p and Aut7p, two novel microtubule-associated proteins are essential for delivery of autophagic vesicles to the vacuole. *Embo J* **17**: 3597-3607.



- Latchinian-Sadek, L., and Thomas, D.Y. (1993) Expression, purification, and characterization of the yeast KEX1 gene product, a polypeptide precursor processing carboxypeptidase. *J Biol Chem* **268**: 534-540.
- Lauber, K., Appel, H.A., Schlosser, S.F., Gregor, M., Schulze-Osthoff, K., and Wesselborg, S. (2001) The adapter protein apoptotic protease-activating factor-1 (Apaf-1) is proteolytically processed during apoptosis. *J Biol Chem* **276**: 29772-29781.
- Lechner, J., and Wieland, F. (1989) Structure and biosynthesis of prokaryotic glycoproteins. *Annu Rev Biochem* **58**: 173-194.
- Lee, N., Bertholet, S., Debrabant, A., Muller, J., Duncan, R., and Nakhasi, H.L. (2002) Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite Leishmania. *Cell Death Differ* **9**: 53-64.
- Lehle, L., and Tanner, W. (1976) The specific site of tunicamycin inhibition in the formation of dolichol-bound N-acetylglucosamine derivatives. *FEBS Lett* **72**: 167-170.
- Lehle, L., Strahl, S., and Tanner, W. (2006) Protein glycosylation, conserved from yeast to man: a model organism helps elucidate congenital human diseases. *Angew Chem Int Ed Engl* **45**: 6802-6818.
- Leist, M., and Jaattela, M. (2001) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 589-598.
- Lesage, G., and Bussey, H. (2006) Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 317-343.
- Levine, B., and Klionsky, D.J. (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* **6**: 463-477.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., and Yuan, J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**: 491-501.
- Li, J., Lee, B., and Lee, A.S. (2006a) Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. *J Biol Chem* **281**: 7260-7270.
- Li, L.Y., Luo, X., and Wang, X. (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**: 95-99.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**: 479-489.
- Li, W., Sun, L., Liang, Q., Wang, J., Mo, W., and Zhou, B. (2006b) Yeast AMID homologue Ndi1p displays respiration-restricted apoptotic activity and is involved in chronological aging. *Mol Biol Cell* **17**: 1802-1811.
- Ligr, M., Madeo, F., Frohlich, E., Hilt, W., Frohlich, K.U., and Wolf, D.H. (1998) Mammalian Bax triggers apoptotic changes in yeast. *FEBS Lett* **438**: 61-65.
- Lockshin, R.A., and Williams, C.M. (1964) Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J. Insect Physiol* **10**.
- Lockshin, R.A., and Zakeri, Z. (2001) Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 545-550.
- Longo, V.D., Ellerby, L.M., Bredesen, D.E., Valentine, J.S., and Gralla, E.B. (1997) Human Bcl-2 reverses survival defects in yeast lacking superoxide dismutase and delays death of wild-type yeast. *J Cell Biol* **137**: 1581-1588.
- Ludovico, P., Sousa, M.J., Silva, M.T., Leao, C., and Corte-Real, M. (2001) *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiology* **147**: 2409-2415.
- Ludovico, P., Rodrigues, F., Almeida, A., Silva, M.T., Barrientos, A., and Corte-Real, M. (2002) Cytochrome c release and mitochondria involvement in programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **13**: 2598-2606.

- Madeo, F., Frohlich, E., and Frohlich, K.U. (1997) A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *J Cell Biol* **139**: 729-734.
- Madeo, F., Frohlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S.J., Wolf, D.H., and Frohlich, K.U. (1999) Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J Cell Biol* **145**: 757-767.
- Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lachelt, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S.J., Wesselborg, S., and Frohlich, K.U. (2002) A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol Cell* **9**: 911-917.
- Madeo, F., Herker, E., Wissing, S., Jungwirth, H., Eisenberg, T., and Frohlich, K.U. (2004) Apoptosis in yeast. *Curr Opin Microbiol* **7**: 655-660.
- Manon, S., Chaudhuri, B., and Guerin, M. (1997) Release of cytochrome c and decrease of cytochrome c oxidase in Bax-expressing yeast cells, and prevention of these effects by coexpression of Bcl-xL. *FEBS Lett* **415**: 29-32.
- Marshall, K.R., Gong, M., Wodke, L., Lamb, J.H., Jones, D.J., Farmer, P.B., Scrutton, N.S., and Munro, A.W. (2005) The human apoptosis-inducing protein AMID is an oxidoreductase with a modified flavin cofactor and DNA binding activity. *J Biol Chem* **280**: 30735-30740.
- Masson, J.Y., and Ramotar, D. (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* IMP2 gene encodes a transcriptional activator that mediates protection against DNA damage caused by bleomycin and other oxidants. *Mol Cell Biol* **16**: 2091-2100.
- Mayer, M., and Noble, M. (1994) N-acetyl-L-cysteine is a pluripotent protector against cell death and enhancer of trophic factor-mediated cell survival in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 7496-7500.
- Mazzoni, C., Herker, E., Palermo, V., Jungwirth, H., Eisenberg, T., Madeo, F., and Falcone, C. (2005) Yeast caspase 1 links messenger RNA stability to apoptosis in yeast. *EMBO Rep* **6**: 1076-1081.
- Mieczkowski, P.A., Fikus, M.U., and Ciesla, Z. (1997) Characterization of a novel DNA damage-inducible gene of *Saccharomyces cerevisiae*, DIN7, which is a structural homolog of the RAD2 and RAD27 DNA repair genes. *Mol Gen Genet* **253**: 655-665.
- Mitsui, K., Nakagawa, D., Nakamura, M., Okamoto, T., and Tsurugi, K. (2005) Valproic acid induces apoptosis dependent of Ycalp at concentrations that mildly affect the proliferation of yeast. *FEBS Lett* **579**: 723-727.
- Modjtahedi, N., Giordanetto, F., Madeo, F., and Kroemer, G. (2006) Apoptosis-inducing factor: vital and lethal. *Trends Cell Biol* **16**: 264-272.
- Nakagawa, T., and Yuan, J. (2000) Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* **150**: 887-894.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A., and Yuan, J. (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* **403**: 98-103.
- Nakashima, T., Sekiguchi, T., Kuraoka, A., Fukushima, K., Shibata, Y., Komiyama, S., and Nishimoto, T. (1993) Molecular cloning of a human cDNA encoding a novel protein, DAD1, whose defect causes apoptotic cell death in hamster BHK21 cells. *Mol Cell Biol* **13**: 6367-6374.
- Narasimhan, M.L., Damsz, B., Coca, M.A., Ibeas, J.I., Yun, D.J., Pardo, J.M., Hasegawa, P.M., and Bressan, R.A. (2001) A plant defense response effector induces microbial apoptosis. *Mol Cell* **8**: 921-930.
- Ng, F.W., Nguyen, M., Kwan, T., Branton, P.E., Nicholson, D.W., Cromlish, J.A., and Shore, G.C. (1997) p28 Bap31, a Bcl-2/Bcl-XL- and procaspase-8-associated protein in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **139**: 327-338.
- Niederer, K.E., Morrow, D.K., Gettings, J.L., Irick, M., Krawiecki, A., and Brewster, J.L. (2005) Cypermethrin blocks a mitochondria-dependent apoptotic signal initiated by

- deficient N-linked glycosylation within the endoplasmic reticulum. *Cell Signal* **17**: 177-186.
- Normington, K., Kohno, K., Kozutsumi, Y., Gething, M.J., and Sambrook, J. (1989) S. cerevisiae encodes an essential protein homologous in sequence and function to mammalian BiP. *Cell* **57**: 1223-1236.
- O'Brien, I.E., Reutelingsperger, C.P., and Holdaway, K.M. (1997) Annexin-V and TUNEL use in monitoring the progression of apoptosis in plants. *Cytometry* **29**: 28-33.
- Ogawa, M., Yoshimori, T., Suzuki, T., Sagara, H., Mizushima, N., and Sasakawa, C. (2005) Escape of intracellular Shigella from autophagy. *Science* **307**: 727-731.
- Okamura, K., Kimata, Y., Higashio, H., Tsuru, A., and Kohno, K. (2000) Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, Ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* **279**: 445-450.
- Paquet, M.E., Cohen-Doyle, M., Shore, G.C., and Williams, D.B. (2004) Bap29/31 influences the intracellular traffic of MHC class I molecules. *J Immunol* **172**: 7548-7555.
- Patil, C., and Walter, P. (2001) Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr Opin Cell Biol* **13**: 349-355.
- Plummer, T.H., Jr., and Kimmel, M.T. (1980) An improved spectrophotometric assay for human plasma carboxypeptidase N1. *Anal Biochem* **108**: 348-353.
- Pouliot, J.J., Robertson, C.A., and Nash, H.A. (2001) Pathways for repair of topoisomerase I covalent complexes in Saccharomyces cerevisiae. *Genes Cells* **6**: 677-687.
- Prakash, S., and Prakash, L. (2000) Nucleotide excision repair in yeast. *Mutat Res* **451**: 13-24.
- Qiu, J., Yoon, J.H., and Shen, B. (2005) Search for apoptotic nucleases in yeast: role of Tat-D nuclease in apoptotic DNA degradation. *J Biol Chem* **280**: 15370-15379.
- Ramirez, R., Carracedo, J., Jimenez, R., Canela, A., Herrera, E., Aljama, P., and Blasco, M.A. (2003) Massive telomere loss is an early event of DNA damage-induced apoptosis. *J Biol Chem* **278**: 836-842.
- Rao, R.V., Ellerby, H.M., and Bredesen, D.E. (2004) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ* **11**: 372-380.
- Reinders, J., Zahedi, R.P., Pfanner, N., Meisinger, C., and Sickmann, A. (2006) Toward the complete yeast mitochondrial proteome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics. *J Proteome Res* **5**: 1543-1554.
- Reiter, J., Herker, E., Madeo, F., and Schmitt, M.J. (2005) Viral killer toxins induce caspase-mediated apoptosis in yeast. *J Cell Biol* **168**: 353-358.
- Ribeiro, G.F., Corte-Real, M., and Johansson, B. (2006) Characterization of DNA damage in yeast apoptosis induced by hydrogen peroxide, acetic acid, and hyperosmotic shock. *Mol Biol Cell* **17**: 4584-4591.
- Riel, C. (2000) Untersuchungen der Apoptose im Zusammenhang mit Defekten der N.Glykosylierung bei *Saccharomyces cerevisiae*. *Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zellbiologie und Pflanzenphysiologie der naturwissenschaftlichen Fakultät III - Biologie und Vorklinische Medizin der Universität Regensburg*.
- Rose, M.D., Misra, L.M., and Vogel, J.P. (1989) KAR2, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian BiP/GRP78 gene. *Cell* **57**: 1211-1221.
- Saleh, M., Vaillancourt, J.P., Graham, R.K., Huyck, M., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Steinberg, M.H., Nolan, V., Baldwin, C.T., Hotchkiss, R.S., Buchman, T.G., Zehnbauser, B.A., Hayden, M.R., Farrer, L.A., Roy, S., and Nicholson, D.W. (2004) Differential modulation of endotoxin responsiveness by human caspase-12 polymorphisms. *Nature* **429**: 75-79.
- Sanchez, A., Alvarez, A.M., Benito, M., and Fabregat, I. (1997) Cycloheximide prevents apoptosis, reactive oxygen species production, and glutathione depletion induced by

- transforming growth factor beta in fetal rat hepatocytes in primary culture. *Hepatology* **26**: 935-943.
- Saraiva, L., Silva, R.D., Pereira, G., Goncalves, J., and Corte-Real, M. (2006) Specific modulation of apoptosis and Bcl-xL phosphorylation in yeast by distinct mammalian protein kinase C isoforms. *J Cell Sci* **119**: 3171-3181.
- Saunders, J.W., Jr. (1966) Death in embryonic systems. *Science* **154**: 604-612.
- Schiestl, R.H., and Gietz, R.D. (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet* **16**: 339-346.
- Schmitt, M.E., Brown, T.A., and Trumpower, B.L. (1990) A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **18**: 3091-3092.
- Scorrano, L., Oakes, S.A., Opferman, J.T., Cheng, E.H., Sorcinelli, M.D., Pozzan, T., and Korsmeyer, S.J. (2003) BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>: a control point for apoptosis. *Science* **300**: 135-139.
- Scott, R.C., Juhasz, G., and Neufeld, T.P. (2007) Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Curr Biol* **17**: 1-11.
- Shor, E., Weinstein, J., and Rothstein, R. (2005) A genetic screen for top3 suppressors in *Saccharomyces cerevisiae* identifies SHU1, SHU2, PSY3 and CSM2: four genes involved in error-free DNA repair. *Genetics* **169**: 1275-1289.
- Silberstein, S., Collins, P.G., Kelleher, D.J., and Gilmore, R. (1995) The essential OST2 gene encodes the 16-kD subunit of the yeast oligosaccharyltransferase, a highly conserved protein expressed in diverse eukaryotic organisms. *J Cell Biol* **131**: 371-383.
- Silva, R.D., Sotoca, R., Johansson, B., Ludovico, P., Sansonetty, F., Silva, M.T., Peinado, J.M., and Corte-Real, M. (2005) Hyperosmotic stress induces metacaspase- and mitochondria-dependent apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **58**: 824-834.
- Simmen, T., Aslan, J.E., Blagoveshchenskaya, A.D., Thomas, L., Wan, L., Xiang, Y., Feliciangeli, S.F., Hung, C.H., Crump, C.M., and Thomas, G. (2005) PACS-2 controls endoplasmic reticulum-mitochondria communication and Bid-mediated apoptosis. *Embo J* **24**: 717-729.
- Smith, C.A., Farrah, T., and Goodwin, R.G. (1994) The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* **76**: 959-962.
- Steinmetz, L.M., Scharfe, C., Deutschbauer, A.M., Mokranjac, D., Herman, Z.S., Jones, T., Chu, A.M., Giaever, G., Prokisch, H., Oefner, P.J., and Davis, R.W. (2002) Systematic screen for human disease genes in yeast. *Nat Genet* **31**: 400-404.
- Sugiura, M., and Takagi, H. (2006) Yeast cell death caused by mutation of the OST2 gene encoding the epsilon-subunit of *Saccharomyces cerevisiae* oligosaccharyltransferase. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**: 1234-1241.
- Sulston, J.E., and Horvitz, H.R. (1977) Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **56**: 110-156.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M., and Kroemer, G. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**: 441-446.
- te Heesen, S., Janetzky, B., Lehle, L., and Aeby, M. (1992) The yeast WBP1 is essential for oligosaccharyl transferase activity in vivo and in vitro. *Embo J* **11**: 2071-2075.
- te Heesen, S., Knauer, R., Lehle, L., and Aeby, M. (1993) Yeast Wbp1p and Swp1p form a protein complex essential for oligosaccharyl transferase activity. *Embo J* **12**: 279-284.
- Teter, S.A., Eggerton, K.P., Scott, S.V., Kim, J., Fischer, A.M., and Klionsky, D.J. (2001) Degradation of lipid vesicles in the yeast vacuole requires function of Cvt17, a putative lipase. *J Biol Chem* **276**: 2083-2087.

- Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R., Aunins, J., and et al. (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* **356**: 768-774.
- Thornberry, N.A. (1997) The caspase family of cysteine proteases. *Br Med Bull* **53**: 478-490.
- Thornberry, N.A., and Lazebnik, Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science* **281**: 1312-1316.
- Thumm, M., Egner, R., Koch, B., Schlumpberger, M., Straub, M., Veenhuis, M., and Wolf, D.H. (1994) Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **349**: 275-280.
- Travers, K.J., Patil, C.K., Wodicka, L., Lockhart, D.J., Weissman, J.S., and Walter, P. (2000) Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* **101**: 249-258.
- Tsujimoto, Y., and Shimizu, S. (2005) Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**: 1528-1534.
- Uren, A.G., O'Rourke, K., Aravind, L.A., Pisabarro, M.T., Seshagiri, S., Koonin, E.V., and Dixit, V.M. (2000) Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell* **6**: 961-967.
- Vachova, L., and Palkova, Z. (2005) Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia. *J Cell Biol* **169**: 711-717.
- Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J., and Vaux, D.L. (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**: 43-53.
- Verhagen, A.M., Silke, J., Ekert, P.G., Pakusch, M., Kaufmann, H., Connolly, L.M., Day, C.L., Tikoo, A., Burke, R., Wrobel, C., Moritz, R.L., Simpson, R.J., and Vaux, D.L. (2002) HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* **277**: 445-454.
- Vernet, T., Dignard, D., and Thomas, D.Y. (1987) A family of yeast expression vectors containing the phage fl intergenic region. *Gene* **52**: 225-233.
- Vijayraghavan, U., Company, M., and Abelson, J. (1989) Isolation and characterization of pre-mRNA splicing mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **3**: 1206-1216.
- Wacker, M., Linton, D., Hitchen, P.G., Nita-Lazar, M., Haslam, S.M., North, S.J., Panico, M., Morris, H.R., Dell, A., Wren, B.W., and Aebi, M. (2002) N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science* **298**: 1790-1793.
- Walter, D., Wissing, S., Madeo, F., and Fahrenkrog, B. (2006) The inhibitor-of-apoptosis protein Bir1p protects against apoptosis in *S. cerevisiae* and is a substrate for the yeast homologue of Omi/HtrA2. *J Cell Sci* **119**: 1843-1851.
- Wang, H., Li, J., Bostock, R.M., and Gilchrist, D.G. (1996) Apoptosis: A Functional Paradigm for Programmed Plant Cell Death Induced by a Host-Selective Phytotoxin and Invoked during Development. *Plant Cell* **8**: 375-391.
- Wang, T.F., Kleckner, N., and Hunter, N. (1999) Functional specificity of MutL homologs in yeast: evidence for three Mlh1-based heterocomplexes with distinct roles during meiosis in recombination and mismatch correction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 13914-13919.
- Westermann, B., and Neupert, W. (2000) Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16**: 1421-1427.
- Wissing, S., Ludovico, P., Herker, E., Buttner, S., Engelhardt, S.M., Decker, T., Link, A., Proksch, A., Rodrigues, F., Corte-Real, M., Frohlich, K.U., Manns, J., Cande, C.,

- Sigrist, S.J., Kroemer, G., and Madeo, F. (2004) An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast. *J Cell Biol* **166**: 969-974.
- Wu, M., Xu, L.G., Li, X., Zhai, Z., and Shu, H.B. (2002) AMID, an apoptosis-inducing factor-homologous mitochondrion-associated protein, induces caspase-independent apoptosis. *J Biol Chem* **277**: 25617-25623.
- Wyllie, A.H. (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **284**: 555-556.
- Wysocki, R., and Kron, S.J. (2004) Yeast cell death during DNA damage arrest is independent of caspase or reactive oxygen species. *J Cell Biol* **166**: 311-316.
- Ye, Y., Meyer, H.H., and Rapoport, T.A. (2001) The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature* **414**: 652-656.
- Yousefi, S., Perozzo, R., Schmid, I., Ziemiecki, A., Schaffner, T., Scapozza, L., Brunner, T., and Simon, H.U. (2006) Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol* **8**: 1124-1132.
- Zhao, X., and Blobel, G. (2005) A SUMO ligase is part of a nuclear multiprotein complex that affects DNA repair and chromosomal organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 4777-4782.
- Zhu, T., and Rost, T.L. (2000) Directional cell-to-cell communication in the Arabidopsis root apical meristem: III. Plasmodesmata turnover and apoptosis in meristem and root cap cells during four weeks after germination. *Protoplasma* **213**: 99-107.

# **Danksagung**

Allen, die mich im Laufe der Zeit, in der diese Arbeit entstanden ist, begleitet haben, möchte ich an dieser Stelle Dank sagen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Ludwig Lehle für die Bereitstellung des überaus interessanten Themas. Er nahm viel positiven Einfluss auf die Arbeit und hat mich in jeglicher Hinsicht unterstützt, ohne dabei meine Entfaltungsmöglichkeiten einzuschränken. Seine ständige Ansprechbarkeit bezüglich methodischer und interpretatorischer Diskussionen habe ich dabei ganz besonders zu schätzen gewusst.

Danke an Prof. Dr. Michael Thomm für die Erlaubnis, den MoFlo Zellsorter wieder zu reaktivieren und meine Messungen dort durchzuführen. Dies hat mir tägliche Fußmärsche ans Klinikum erspart. Wolfgang Forster, danke ich für seine Hilfe am MoFlo Zellsorter. Er stand mir stets zur Seite, wenn Probleme auftraten.

Prof. Dr. Jürgen Stolz und Prof. Dr. Frank Madeo danke ich für die Bereitstellung der Plasmide. Ihr Interesse an meiner Arbeit und die aufschlussreichen Diskussionen haben zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Guido Grossmann danke ich für die Einweisung am konfokalen Mikroskop. Nicht selten habe ich seine Tipps dankend angenommen. Des Weiteren Vielen Dank an die Arbeitsgruppe Stolz, vor allem Christian Vogel und Stefan Ringelstetter. Hier wurde man immer mit offenen Armen empfangen, auch wenn man nur zum „Schnorren“ kam.

Aus der Arbeitsgruppe Lehle geht mein herzlichster Dank an Katrin Hese und Tanja Bickel, die mir nicht nur wegen Ihres fundierten Wissens über den Umgang mit Proteinen sehr behilflich waren. Meinen Praktikanten, vor allem Verena Schmeisser, Georg Schmied und Nicholas Putz, danke ich für Ihr Engagement und Ihr Interesse – es hat Spaß gemacht Euch zu betreuen. Vielen Dank auch an unsere Diplomanden Laura Klingseisen, Sonja Nieratschker und Michael Kämpf, die für ein angenehmes Arbeitsklima in unserem Labor gesorgt haben.

Angelika Rechenmacher und Michael Schmitzberger danke ich für die unzähligen kleinen Arbeiten, die sie mir während meiner Zeit im Labor abgenommen haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich in jeglicher Hinsicht unterstützt haben – ohne Euch wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Und nicht zuletzt danke ich Kathi für ihre Begleitung und Stärkung während dieser entscheidenden Lebensphase.

## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne zulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Regensburg, den 12.10.2007